

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología



Regulación ambiental de la movilidad en *Pseudomonas fluorescens* F113

TESIS DOCOTORAL

Candelas Muriel Fernandez

Madrid, 2018

Memoria presentada por la licenciada en Biología
Candelas Muriel Fernández para optar al Título de Doctor

Fdo. Candelas Muriel Fernández

Los directores

Fdo. Dra. Marta Martín Basanta

Profesor Titular

Dpto. de Biología

Universidad Autónoma de Madrid

Fdo. Dr. Rafael Rivilla Palma

Profesor Titular

Dpto. de Biología

Universidad Autónoma de Madrid

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mis directores, el Dr. Rafael Rivilla Palma y la Dra. Marta Martín Basanta por supervisar este trabajo. Gracias por vuestra ayuda, paciencia y experiencia, sin las cuales esta Tesis no hubiera sido posible.

Quiero agradecer también a la Dra. Rebecca Parales y al Dr. Jacob G. Malone por acogerme en sus grupos de investigación durante mis dos estancias predoctorales y tener momentos para discutir los resultados obtenidos. También a la Dra. Maribel Ramos Gonzalez por dejarme material utilizado en esta Tesis e invitarme a pasar unos días en su laboratorio.

Este trabajo ha sido financiado por el programa FPI y los proyectos BIO 2012 31634 y BIO 2015 64480R (Ministerio de Economía, Industria y Competividad), así como las ayudas EEBB-1-15-00681 y EEBB-1-17-122277 para la realización de las estancias predoctorales disfrutadas

Agradecimientos personales

Todo llega...y el final de este largo recorrido por fin toma forma. Recuerdo perfectamente cuando allá por mayo del año 2009 me entrevisté con Rafa y Marta para valorar la posibilidad de realizar el trabajo final de carrera durante el curso siguiente en su laboratorio. ¡Válgame, nueve años han pasado desde entonces! Mi primer agradecimiento es para ellos, gracias por confiar en mí, por ofrecerme esta oportunidad, por sacar momentos de debajo de las piedras para atenderme y por vuestro apoyo en todos los momentos vividos (buenos y regulares) desde entonces. Después me lancé a cursar el postgrado de microbiología, una de las decisiones más acertadas que he tomado en mi vida. A pesar de que fue un año de muchos trabajos, exámenes y agobios varios, quiero agradecer a todos los profesores que lo imparten por los conocimientos recibidos y hacer de alguna manera que hoy este escribiendo estas líneas. Gracias también a todos los compañeros del master, casi ninguno nos conocíamos, sin embargo, he mantenido relaciones muy estrechas con algunos de ellos (Ana, Elvira), siendo compañeros de tesis durante todos estos años (Maiki, Gere), e incluso ¡la convivencia!, eh, Key, ¿quién nos lo iba a decir? Tras el master llegó el trabajo en El Laboratorio, ese lugar que ha sido mi primera casa durante todo este tiempo. Quiero agradecer a todo el departamento de biología general (¡esa gran familia!) su acogida desde el primer momento. Me vienen tantas caras a la cabeza..., muchos ya no están (Irene, Clusti, Amaya, Belén, Elena, Isidro, Andrea, Isma, Carol, Vir, Ramsy...), otros se fueron y volvieron Ángel, Nines, David y Samu (profe y secretario, ha sido estupendo teneros cerca este último año, no cambiéis nunca, alegráis la vida a cualquiera) ☺ ¡gracias pasillistas! Gracias también a todos los profesores que componen el departamento, muchos de ellos me dieron clase durante la carrera y con algunos he podido vivir la experiencia de estar ``al otro lado`` ayudando en prácticas: Javi, Cris, Pili, Elvira, Eduardo Marco, Eduardo Fernández, Eva...Por otro lado, dentro del grupo, quiero agradecer a los que ya no están, en especial a Fran, por ser mi hermano mayor en esto de la ciencia los primeros años, a María Sánchez-Contreras por darme claves que han sido muy utilices durante la tesis, y a Eva, por poner orden cuando todo era un desastre. También a todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio, parte de esta tesis es vuestra, en especial a Blanca, ¡los años contigo fueron sin duda los mejores! De los que quedan, ¡animo Esther y Dani, valéis mucho! Gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado. Gracias David, por poner humor y música cada día

y gracias Miguel por estar siempre ahí, desde el principio. Como seguro que me dejo a alguien, agradeceremos a TODOS los integrantes del departamento hacer tan fácil la convivencia y demostrar que es posible sentirse a gusto en el lugar de trabajo. ¡Sois un ejemplo a seguir! En general, gracias a la Universidad Autónoma de Madrid, en especial a cada una de las personas que trabajan en la Facultad de Biología, por la formación recibida durante todos estos años por parte de los profesores, las bromas en la cafetería (Juan y Chiqui, ¡sois unos genios!), el personal de limpieza y todos los alumnos que han pasado por aquí, haciendo que la universidad esté viva. Gracias también a toda la gente que he conocido durante las estancias, sean amigos; Juan, Silvia, Jaime, Alba, Félix, Pilar, Javi, Pablo, etc., o compañeros de laboratorio; Rita, Richard, Lucia, Stuart, Francesca, Sebastian, Eleni... gracias por hacer esos meses más acogedores. Gracias a María y a Víctor por su ayuda durante mis dos semanas en el Zaidín. Y gracias a todos los amigos de congresos, por esos ratos tan divertidos (¡malagueños, sevillanos y granainos tenían que ser!). Por supuesto agradecer, fuera ya de la universidad (aunque con ellos todo comenzó en el sótano) ☺, ¡¡muchísimas gracias mis biolocos!! Chicos, son ya doce años de amistad y ¡cada día nos queremos más! Sois de las mejores cosas que me han pasado en la vida. Gracias también a la familia de Energy Control (¡otra gran familia ejemplar!) donde he aprendido tanto, en especial a las energy girls, Berta, Itxi, Desi, Ana, Rita, etc..y a Patricia, sé que siempre estás ahí. En lo más personal sonará raro, pero quiero que forme parte de estos agradecimientos Muse, mi gata, por su compañía, sobre todo este último mes de clausura, en el que sus maullidos y pedidas de atención me han hecho ver que había vida detrás de la pantalla del ordenador ☺. Quiero darle muchísimas gracias a Edu, por apoyarme en todo y por comprender y respetar mi prioridad, que, aunque a tí esto de la ciencia te quede lejos, estás dispuesto a seguirme donde me (nos) lleve el destino, gracias de corazón (sobre todo por aguantarme estos últimos días). Por último, gracias a mis padres, esta tesis va dedicada a vosotros, por apoyarme siempre y porque todo lo que soy os lo debo. Seguramente me dejo personas en el tintero, así que cierro con un agradecimiento global que incluye a cada una de las personas que han formado parte de mi vida durante estos años, ya que como somos lo que los demás nos ofrecen, esta tesis también es vuestra.

¡Gracias a todos!

"Quien no haya experimentado
la irresistible atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía."
Frankenstein. Mary Shelley

Índice

Página

Clave de abreviaturas.....	xiii
Índice de Figuras	xv
Índice de Tablas.....	xvii
Resumen	1
Capítulo 1. Introducción General.....	5
1. La rizosfera como ecosistema.	7
2. Los microorganismos en la rizosfera	10
2.1 PGPRs	13
2.2 Colonización de la rizosfera por las PGPRs.....	14
2.3 Las <i>Pseudomonas</i> fluorescentes como PGPRs.....	16
3. El género <i>Pseudomonas</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	17
4. Factores implicados en la colonización de la rizosfera	20
4.1 Movilidad y Quimiotaxis.....	24
4.1.1 Movilidad dependiente de flagelo: estructura y regulación flagelar.....	25
4.1.2 Regulación de la movilidad en <i>P. fluorescens</i> F113.....	30
4.1.3 Movilidad quimiotáctica.....	33
4.2 La variación de fase	40
4.3 Adhesión al sustrato y formación de biopelículas	43
4.4 El c-di-GMP	46
4.4.1 Metabolismo y regulación del c-di-GMP.....	47
4.4.2. Fenotipos regulados por el c-di-GMP.....	52
4.5. AmrZ como regulador global de respuestas al ambiente	57
Referencias.....	59
Objetivos.....	77
Capítulo 2. AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in <i>P. fluorescens</i> F113	81
Summary	83
Introduction	85
Materials and Methods.....	86
Results	90
Discussion.....	98

Conclusions	101
Acknowledgments.....	101
References.....	102
Supplementary	105
References.....	110
Capítulo 3. c-di-GMP is involved in flagellum synthesis in <i>P. fluorescens</i> F113.....	111
Summary	113
Introduction	115
Material and Methods	117
Results	121
Discussion	129
References.....	134
Supplementary	137
References.....	142
Capítulo 4. Chemotactic motility of <i>P. fluorescens</i> F113 under aerobic and denitrification conditions	143
Summary	145
Introduction	147
Material and Methods	149
Results	151
Discussion.....	157
Acknowledgements.....	160
References.....	161
Supplementary	163
References.....	167
Anexo Capítulo 4. Análisis de perfiles quimiotácticos	169
Referencias.....	174
Capítulo 5. Discusión General.....	175
Referencias	190
Conclusiones	195
Lista de publicaciones	199

Clave de abreviaturas

Amp	Ampicilina
ANOVA	Análisis de la varianza
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
c-di-GMP	(3'→5') diguanosin monofosfato cíclico
Che	<i>Chemotaxis protein</i>
C-terminal	Extremo Carboxilo
CW	Giro en sentido de las agujas del reloj
CWW	Giro en sentido contrario a la agujas del reloj
DAPG	2,4-Diacetilfloroglucinol
DGC	Diguanilato ciclasa
DTT	Dithiothreitol
EAL	Motivo Glu-Ala-Leu (típico de fosfodiesterasas)
EPS	Exopolisacáridos
FP	<i>Fahraeus for plant media</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FPKM	<i>Fragments Per Kb of transcript per Million mapped reads</i> (unidad de normalización de fragmentos por gen en RNA-Seq)
GAF	Dominio Sensor (Motivo Arg-Asn-Lys-Asp).
GGDEF	Motivo Gly-Gly-Asp-Glu-Phe (típico de diguanilato ciclasas)
gfp	<i>Green fluorescent protein</i>
Gm	Gentamicina
HCN	Ácido cianhídrico
HD-GYP	Motivo His-Asp-Gly-Tyr-Pro (típico de fosfodiesterasas)
HDOD	<i>HD output domain</i> . (Motivo His-Asp)
His₆	Secuencia de aminoácidos compuesta por seis histidinas
IPTG	<i>Isopropyl-beta-D-thiogalactoside</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
KB	<i>King's B media</i>
k_D	Constante de disociación aparente
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LBR	<i>Ligand-binding región</i> (región de unión a ligando de MCP)
MCP	<i>Metil-accepting chemotaxis protein</i> (proteínas aceptoras de grupo metilo)
N-terminal	Extremo amino
OD	Densidad optica
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (marco de lectura abierta)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAS	Dominio sensor. (<i>Per-ARNT-Sim</i>)

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PDE	Fosfodiesterasa
PGPR	<i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i>
Pip	Piperacilina
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
QS	Quorum Sensing
REC	Dominio regulador de respuesta
RHH	<i>Ribbon-Helix-Helix</i> . (Dominio de unión a DNA)
RNA-Seq	Secuenciación de RNA
rpm	Revoluciones por minuto
SA	<i>Sucrose Asparagin media</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Spc	Espectinomicina
sp.	Especie
spp.	Especies
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
Tc	Tetraciclina
ufc	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta
VOCs	<i>Volatile organic compounds</i>
wt	<i>Wild type</i>

Índice de Figuras

Página

Capítulo 1. Introducción General.

Figura 1.1: Representación esquemática de la rizosfera	9
Figura 1.2: Colonización de la rizosfera por <i>P. fluorescens</i> F113.....	21
Figura 1.3: Organización genética de los genes de desnitrificación en F113	23
Figura 1.4: Esquema simplificado de la estructura del flagelo bacteriano.....	27
Figura 1.5: Rutas de regulación de la movilidad en <i>P. fluorescens</i> F113	32
Figura 1.6: Quimiotaxis en <i>E. coli</i>	34
Figura 1.7: Esquema de la transducción de señales quimiotácticas.....	36
Figura 1.8: Etapas en la formación de una biopelícula.....	44
Figura 1.9: Metabolismo y regulación del c-di-GMP	48

Capítulo 2: AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *P. fluorescens* F113.

Figura 2.1: AmrZ affect motility, biofilms formation and competitive rizhosphere colonización.....	90
Figura 2.2: AmrZ regulates exopolysaccharide production and c-di-GMP levels.....	92
Figura 2.3: AmrZ transcriptionally regulates a large number of genes implicated in c-di-GMP turnover.....	95
Figura 2.4: Most of c-di-GMP relates genes that are directly regulaed by AmrZ are Involved in motility and/or biofilm formation	97
Figura S2.1: Biofilms formation on glass tubes.....	107
Figura S2.2: Phenotype complementation analysis of the mutants.....	107

Capítulo 3. c-di-GMP is involved in flagellum synthesis in *P. fluorescens* F133.

Figura 3.1: The DGCs GcbA and AdrA are involved in the flagelar synthesis pathway.....	122
Figura 3.2: Two novel HDOD domain proteins are implicated in the regulation of swimming motility	123
Figura 3.3: <i>hdmA</i> and <i>hdmB</i> participate in the same regulatory pathway than <i>sadB</i> and <i>gacA</i>	125
Figura 3.4: SadB c-di-GMP binding assays	127
Figura 3.5: HdmA c-di-GMP binding assays	128
Figura 3.6: HdmB c-di-GMP binding assays	128
Figura S3.1: <i>hdmB</i> and <i>hdmA</i> gene complementation	139

Figura S3.2: Relative swimming motility of <i>E. coli</i> DH5 α harboring overexpression pME6032 vector	139
Figura S3.3: GcbA and AdrA appears act as DGCs	140
Capítulo 4: Chemotactic motility of <i>P. fluorescens</i> F113 under aerobic and denitrification conditions.	
Figura 4.1: Growth of <i>P. fluorescens</i> F113 under desnitrification conditions	152
Figura 4.2: Motility regulation under desnitrification conditions	154
Figura 4.3: <i>P. fluorescens</i> possesses three independent and functional chemotaxis systems	155
Figura 4.4: The three chemotaxis systems are important for rizhosphere colonization.....	157
Figura S4.1: Flagella visualization	165
Figura S4.2: Genetic organization of the three chemotaxis systems	165
Figura A4.1: Perfiles quimiotáticos de <i>P. fluorescens</i> F113 y los mutantes <i>cheA2</i> y <i>cheA3</i>	173
Capítulo 5. Discusión General.	
Figura 5.1: Posible modelo de regulación de la síntesis del aparato flagelar con el c-di-GMP como protagonista	184

Índice de Tablas

Página

Capítulo 2: AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *P. fluorescens* F113.

Tabla 2.1: c-di-GMP related genes identifies as putative AmrZ binding targets94

Tabla S2.1: Bacterial strains and plasmids used in this study..... 108

Tabla S2.2: AmrZ transcriptional regulation of genes implicated in c-di-GMP turnover 109

Capítulo 3. c-di-GMP is involved in flagellum synthesis in *P. fluorescens* F133.

Tabla S3.1: Bacterial strains and plasmids used in this study..... 141

Capítulo 4: Chemotactic motility of *P. fluorescens* F113 under aerobic and denitrification conditions.

Tabla 4.1: Yield (max OD₆₀₀) of *P. fluorescens* F113 growth under anaerobic conditions... 151

Tabla S4.1: Bacterial strains and plasmids used in this study..... 166

Tabla S4.2: Primers used in this study. 166

Tabla A4.1: Compuestos analizados en los ensayos de perfiles quimiotáticos 171

Capítulo 5. Discusión General.

Tabla 5.1: Genes relacionados con el c-di-GMP en *P. fluorescens* F113 185

Resumen

La rizosfera es un nicho ecológico muy complejo donde habitan multitud de microorganismos, entre ellos, las bacterias que promueven el crecimiento vegetal, denominadas PGPRs (*Plant-growth promoting rhizobacteria*). *Pseudomonas fluorescens* F113 coloniza la rizosfera de muchas plantas de interés agrícola y se sabe que contiene multitud de caracteres implicados en la promoción del crecimiento vegetal y en el control biológico de fitopatógenos. Para que esta bacteria pueda actuar como una verdadera PGPR debe persistir durante un tiempo llevando a cabo una colonización competente y eficaz de la raíz. Entre otros factores, la movilidad dependiente de flagelos juega un papel destacado en el proceso de competencia. La regulación de la movilidad en esta cepa está finamente controlada por las condiciones ambientales presentando una compleja red de señalización que controla tanto la síntesis como la función flagelar. Además, esta cepa presenta un segundo aparato flagelar que incrementa su capacidad de colonización competitiva de la rizosfera. Para profundizar en el conocimiento de la regulación de la movilidad de *P. fluorescens* F113 en respuesta a los factores ambientales, se ha abordado el estudio de diferentes procesos implicados en la red de señalización como son: la función del regulador transcripcional AmrZ, el diguanilato cíclico (c-di-GMP) y su papel en la síntesis del aparato flagelar, así como la caracterización funcional de los sistemas de quimiotaxis durante el proceso de colonización de la raíz. En este trabajo se ha demostrado que el regulador global AmrZ, además de regular directamente la expresión de genes de ambos flagelos, actúa también a través del mantenimiento de los niveles de c-di-GMP. Además, se han caracterizado dos diguanilato ciclasas (GcbA y AdrA) y dos proteínas HDOD (HdmA y HdmB) implicadas en el metabolismo del c-di-GMP que participan en la ruta de biosíntesis del aparato flagelar. Por último, se ha demostrado que los tres sistemas quimiotácticos completos que presenta *P. fluorescens* F113 en su genoma, son funcionales, independientes y esenciales para una correcta colonización de la planta, siendo la expresión del sistema Che3 necesaria para la movilidad en condiciones limitantes de oxígeno.

Capítulo 1

Introducción General

1. La rizosfera como ecosistema.

Existen numerosos ambientes microbianos, cada uno de ellos con características propias y todos fundamentales para el desarrollo y equilibrio de la vida en la Tierra. El suelo es uno de los hábitats con más biodiversidad biológica del planeta. Se ha estimado que en un gramo de suelo hay más de un billón de células bacterianas pertenecientes a decenas de miles de taxones diferentes, más de 200 metros de hifas fúngicas y un amplio rango de nematodos y artrópodos (Bardgett & van der Putten, 2014, Muller *et al.*, 2016). La complejidad de este ecosistema ha hecho difícil el abordaje de su estudio, aunque en los últimos años, las técnicas de metagenómica han permitido aseverar que el suelo es un ecosistema en el que los seres vivos más abundantes son los microorganismos (Fierer *et al.*, 2012, Knief, 2014). Además, la metatranscriptómica está permitiendo comprender la relación estructura-función de este ecosistema (Newman *et al.*, 2016). Cabe destacar que muchos de los microorganismos que forman parte de este nicho ecológico son desconocidos hasta la fecha, ya que no son cultivables. Un claro ejemplo, de este hecho, es un análisis llevado a cabo en 596 muestras de suelo recolectadas en Central Park (Nueva York) de las que más del 80% de los microorganismos encontrados no tenían representación en las bases de datos (Ramirez *et al.*, 2014). También lo es el reciente trabajo de Delgado-Baquerizo y colaboradores, en el que examinan los taxones bacterianos dominantes a nivel mundial, recolectando muestras de suelo en los seis continentes. Han identificado que solo el 2% de los taxones bacterianos abarcan la mitad de las comunidades encontradas, pudiendo establecerse como una comunidad dominante y clasificarse dentro de grupos ecológicos, generando así un atlas mundial de las bacterias presentes de forma mayoritaria en los suelos de todo el mundo (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2018).

El papel de estos organismos en el ecosistema es imprescindible para su correcto funcionamiento, formando parte de los ciclos naturales del carbono y del nitrógeno. Los artrópodos, nematodos, protozoos y hongos saprófitos descomponen la materia orgánica transformándola en nutrientes disponibles para el resto de organismos que habitan el suelo y para la planta (Geisen *et al.*, 2015). Las plantas, ayudadas por microorganismos mutualistas, utilizan los nutrientes minerales para volver a transformarlos en materia orgánica, que entrará de nuevo en el ciclo mediante su descomposición. Pero son los microorganismos los que desempeñan el paso clave en el ciclo de los nutrientes, ya que, además de ser los más

abundantes, poseen un metabolismo más versátil. Está demostrado que un proceso esencial para el correcto funcionamiento del ecosistema como es el ciclo del nitrógeno es exclusivamente llevado a cabo por microorganismos. El nitrógeno es un nutriente determinante en la producción agrícola además de que su exceso puede generar problemas medioambientales como son el calentamiento global y la eutrofización de las aguas (Elser *et al.*, 2007, Schlesinger, 2009).

Dentro del ecosistema del suelo encontramos una zona que está influenciada por las raíces de las plantas y que presenta un nicho ecológico adecuado para el desarrollo de multitud de microorganismos. Esta porción del suelo fue por primera vez definida por Hiltner en 1904 y denominada rizosfera. Es un área que no se puede definir de forma detallada, pero si ha podido ser dividida en tres zonas físicas: (i) endorrizosfera, que incluye los tejidos radiculares denominados endodermis y región cortical; (ii) rizoplaneo, zona superficial de la raíz y capa mucilaginosa excretada por la misma y (iii) ectorrizosfera, zona que abarca aproximadamente 5 mm de espesor de suelo adyacente a la raíz (Morgan *et al.*, 2005)(Fig. 1.1).

En la rizosfera ocurren diversas reacciones físicas y químicas que afectan tanto a la estructura del suelo como a los organismos que la habitan, siendo su principal característica la presencia de multitud de productos químicos procedentes de los exudados radiculares secretados por las plantas. En estos exudados encontramos más del 40% del carbono procedente de la fotosíntesis de las plantas (Bais *et al.*, 2006), que proporcionan nutrientes y vitaminas al medio de los que se benefician las comunidades microbianas que allí habitan. A este incremento de actividad microbiana en la rizosfera se le denomina efecto rizosférico, fenómeno por el cual la densidad de microorganismos en la rizosfera es entre 10 y 100 órdenes de magnitud mayor a la densidad encontradas en el suelo circundante, no influenciado por las raíces de las plantas (Buee *et al.*, 2000, Kyselkova *et al.*, 2009, Bakker *et al.*, 2013).

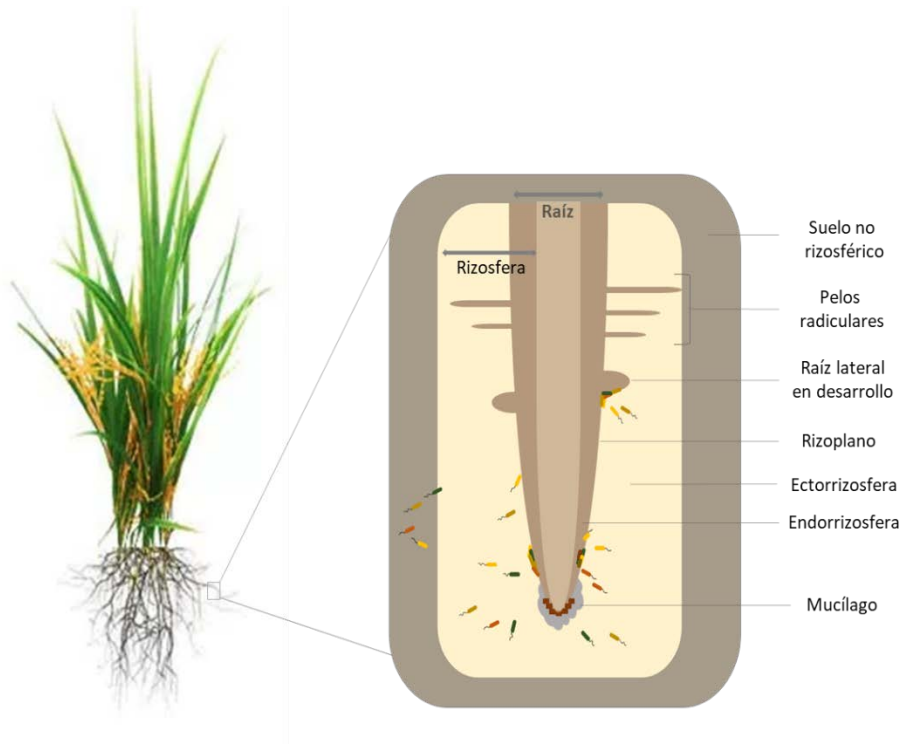


Figura 1.1: Representación esquemática de la rizosfera. Se pueden observar las diferentes partes que componen la rizosfera y como los microorganismos la colonizan.

La cantidad y composición de los exudados radiculares o rizodeposiciones parece ser específica de cada familia de plantas, incluso de cada especie, pero en términos generales podemos clasificarlos en tres tipos: (i) exudados de bajo peso molecular, (ii) exudados de alto peso molecular y (iii) exudados volátiles o VOCs (del inglés *volatile organic compounds*) (Ortiz-Castro *et al.*, 2011). La mayor proporción de los exudados está formada por los compuestos de bajo peso molecular que incluyen monosacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y metabolitos secundarios. Los de alto peso molecular corresponden a proteínas y al mucílago desprendido por la planta y los VOCs están constituidos por alcoholes, aldehídos y otros metabolitos secundarios (Schulz & Dickschat, 2007, Park *et al.*, 2015). Pero no sólo son las plantas las que contribuyen a la riqueza de compuestos químicos encontrados en la rizosfera, si no que los microorganismos que allí se establecen también secretan productos derivados de su metabolismo secundario, como son reguladores el crecimiento vegetal, toxinas, enzimas y sideróforos, entre otros (van Loon, 2007). Algunas de las funciones de estos compuestos serán detalladas a continuación.

2. Los microorganismos en la rizosfera

Las raíces, además de servir como anclaje de la planta al suelo y permitir la captación de agua y nutrientes, son capaces de interactuar con los microorganismos presentes en el suelo y generar un nicho ideal para el desarrollo de los mismos a través de sus exudados. En estos exudados están presentes compuestos que mimetizan las señales *quorum sensing* (QS) de bacterias, principal mecanismo mediante el que se comunican y se autorregulan las poblaciones bacterianas, adaptando su metabolismo a las condiciones cambiantes del ambiente (Whitehead *et al.*, 2001). Al conjunto de microorganismos que habitan la rizosfera se le denomina microbioma rizosférico y está formado por una enorme diversidad de comunidades de microorganismos, comensales, mutualistas y patógenos, que interactúan entre ellos y con la planta de manera positiva o negativa (Mendes *et al.*, 2011, Berendsen *et al.*, 2012). Además, estas interacciones pueden verse afectadas por factores ambientales y antropogénicos, como son la temperatura del suelo ligada al clima (van der Voort *et al.*, 2016) o el uso del suelo (Perez-Jaramillo *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2018), creándose una compleja y multifactorial red de interacciones en este microambiente.

Para poder comprender estas interacciones se utilizan métodos reduccionistas que analizan los efectos de un solo grupo de microorganismos en una función específica, ya que es difícil realizar ensayos a gran escala que reporten información acerca de interacciones multifactoriales. Sin embargo, en la actualidad algunos grupos están empezando a desarrollar este tipo de aproximaciones multifactoriales mediante técnicas de metagenómica y biología computacional dándonos la posibilidad de conocer más sobre las interacciones que ocurren entre los microorganismos que habitan la rizosfera y las funciones que realizan (Delgado-Baquerizo *et al.*, 2017, Succurro *et al.*, 2017).

Dentro de los microorganismos que encontramos en la rizosfera, son las bacterias y los hongos los más abundantes, pudiendo ser clasificados en beneficiosos o patogénicos. A su vez pueden ser microorganismos de vida libre o simbiotes, formando, los segundos, verdaderos órganos en asociación con la raíz de la planta, como es el caso de las bacterias pertenecientes al grupo de rizobiales. En cuanto a las micorrizas representan un componente vital en los ecosistemas, y se encuentran en más del 80% de las plantas terrestres, denominándose micorrizosfera a la zona del suelo influenciada por la raíz y los

hongos micorrícicos (Finlay, 2008). Uno de sus principales efectos es el aumento de la superficie en contacto con el suelo, lo que favorece finalmente una mejora en la captación de nutrientes (Thompson & Cunningham, 2002). Pertenezcan a una u otra categoría, todos ellos tienen la capacidad de influir sobre el desarrollo de las plantas y por ende sobre el rendimiento de los cultivos (Dutta & Podile, 2010).

El tipo de suelo es un factor importante en determinar la composición de las comunidades rizosféricas, siendo el pH el factor que más influencia tiene, seguido de la disponibilidad de nitrógeno, contenido en carbono y temperatura (Lauber *et al.*, 2009, Oliverio *et al.*, 2017). No obstante, en un mismo suelo diferentes especies de plantas pueden seleccionar su microbioma. Esta selección es llevada a cabo por las diferentes composiciones de los exudados radiculares (Haichar *et al.*, 2008). También se han encontrado especies bacterianas similares en suelos muy diferentes, siendo estas seleccionadas por plantas genotípicamente parecidas (Bulgarelli *et al.*, 2012, Lundberg *et al.*, 2012, Peiffer *et al.*, 2013), lo que sugiere la existencia de relaciones coevolutivas entre microorganismos rizosféricos y plantas (Pieterse *et al.*, 2014). Un claro ejemplo de coevolución entre plantas y microorganismos es la existencia de los suelos supresivos de enfermedades, presentes en muchas partes del planeta y algunos de ellos desarrollándose tras un prolongado uso del suelo en agricultura (Philippot *et al.*, 2013). En estos suelos los patógenos no alcanzan las condiciones ideales para establecerse y persistir o si las alcanzan no provocan daños importantes (Weller *et al.*, 2002). Este fenómeno natural puede estar debido a diferentes características del suelo, entre ellas la presencia de multitud de microorganismos beneficiosos como *Trichoderma*, *Fusarium*, *Streptomyces*, *Bacillus* y *Actinomyces* spp, siendo las *Pseudomonas* la especie más estudiada en este tipo de suelos (Mendes *et al.*, 2011) y ha sido demostrado que un aumento en la biodiversidad microbiana de la rizosfera reduce la capacidad de los patógenos para colonizar el suelo (van Elsas *et al.*, 2012). Se barajan diferentes posibles mecanismos causantes de la supresión de la enfermedad en este tipo de suelos, entre los que se encuentran la competición por el espacio y nutrientes y mecanismos de antagonismo mediante la producción de metabolitos secundarios como quelantes de hierro (sideróforos), antibióticos, enzimas líticas y elicitores de la respuesta sistémica inducida en la planta (Loper *et al.*, 2012, Philippot *et al.*, 2013). Pero no son sólo las plantas capaces de modular los microorganismos que habitan su rizosfera a través de los exudados radiculares, los microorganismos también secretan

exudados que alteran el metabolismo de la planta y del resto de organismos presentes en el nicho rizosférico. Estos compuestos pueden ser nutrientes u hormonas, que permiten a la planta crecer e incluso inducir respuestas de defensa a nivel sistémico. También los microorganismos secretan moléculas señal de QS que reciben otras rizobacterias de la microcolonia y antibióticos y antifúngicos que les permiten competir frente a otros organismos por el nicho ecológico.

La mayoría de los estudios sobre la interacción entre plantas y microorganismos ha tenido como objetivo mitigar los efectos de los organismos patógenos sobre los cultivos o atenuar condiciones de estrés abiótico (Bianco & Defez, 2009, Meena *et al.*, 2017). Sin embargo, otros estudios se han centrado en caracterizar las interacciones ecológicas positivas que promueven el crecimiento de las plantas y limitan las enfermedades en los cultivos. La primera evidencia de la existencia de microorganismos del suelo que favorecían de alguna forma el desarrollo de las plantas data de 1938, cuando se observó que el porcentaje de semillas de césped germinadas en suelo no estéril era mayor que el de suelo estéril (Van Luijk, 1938). Tanto las micorrizas como las bacterias presentes en nódulos simbiotes de leguminosas fueron descritas en la segunda mitad del siglo XIX (Morton, 1981). Ya en los años 50 fueron utilizados dos microorganismos beneficiosos, *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megaterium*, para promover el crecimiento de las plantas y mejorar los cultivos (Brown, 1974) y fue durante los años 80 cuando se identificaron varias cepas bacterianas de pseudomonas que promueven el crecimiento vegetal (Teintze *et al.*, 1981). Desde entonces y hasta la fecha, muchas investigaciones han priorizado en la identificación del microbioma promotor del crecimiento vegetal mediante la secuenciación del metagenomas aislados de distintas rizosferas para llegar a conocer los mecanismos a través de los cuales ocurren estas interacciones beneficiosas. Este conocimiento permitirá el diseño de comunidades microbianas con funciones específicas (Busby *et al.*, 2017).

Para que un microorganismo sea considerado beneficioso debe promover de alguna manera el crecimiento de la planta y su salud. Estos microorganismos pueden clasificarse en tres grupos según la forma en la que realizan la actividad beneficiosa: (i) los que aumentan la disponibilidad de nutrientes para la planta (van der Heijden *et al.*, 2008), (ii) los que promueven directamente el crecimiento vegetal mediante señalización química con la planta (Verbon & Liberman, 2016), y (iii) los antagonistas de fitopatógenos (Mendes *et al.*,

2013). Algunos de estos microorganismos pueden pertenecer a más de una categoría, pero lo que es fundamental para todos ellos es que deben ser colonizadores competentes de la raíz y ser capaces de establecerse en ella durante un tiempo, compitiendo con el resto de organismos que allí habitan (Babalola, 2010).

2.1 PGPRs

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (acrónimo del inglés *Plant growth-promoting rhizobacteria*), son bacterias de vida libre que colonizan la rizosfera (Kloepper y Schroth, 1978) y que son capaces de mejorar el estado de las plantas y aumentar la productividad en los cultivos (Kloepper y col., 1989). Dentro de las PGPR podemos encontrar diferentes géneros bacterianos siendo *Pseudomonas* y *Bacillus* los géneros mayoritarios (Podile y Kishore, 2006).

Este tipo de microorganismos puede realizar su función de promoción del crecimiento de la planta y biocontrol de forma directa o indirecta al colonizar las raíces. Son considerados mecanismos directos aquellos que promueven el crecimiento de las plantas directamente, como por ejemplo la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas) o el enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa (ACC deaminasa), la fijación del nitrógeno atmosférico, la síntesis de quelantes de hierro llamados sideróforos o la solubilización de minerales inorgánicos como el fósforo, potasio y zinc, haciéndolos disponibles para la planta. Los mecanismos indirectos son aquellos que producen la inhibición del crecimiento de fitopatógenos mediante diversos procesos como son la producción de antibióticos o antifúngicos, la eliminación del hierro de la rizosfera (a través de la síntesis de sideróforos), la producción de enzimas líticas que atacan a las paredes de los hongos, la competición por nicho y la inducción de respuestas de defensa sistémica en la planta (Vejan *et al.*, 2016). Además, las PGPRs pueden proteger a las plantas del estrés ambiental (Kang *et al.*, 2013). Más de uno de estos mecanismos pueden estar presente en las PGPRs, siendo modulados también por las condiciones ambientales (Mauchline & Malone, 2017).

Durante los últimos 40 años se han desarrollado multitud de estudios gracias a los cuales se ha incrementado el conocimiento sobre los mecanismos mediante los que las PGPRs facilitan el crecimiento de las plantas permitiendo su aplicación para una agricultura sostenible. De hecho, la aplicación de PGPRs como inoculantes está dando buenos resultados en países subtropicales, donde los fertilizantes químicos son recursos limitados (Ceballos *et al.*, 2013). El uso de PGPRs que realizan control biológico, no solo mediante la producción de compuestos químicos antagonistas de los patógenos, sino también, mediante la inducción de respuesta sistémica de defensa en la planta, también está teniendo mucha aceptación (Pieterse *et al.*, 2014). Los microorganismos más estudiados desde el punto de vista del biocontrol de patógenos se encuentran dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma* (Kupferschmied *et al.*, 2013, Mauchline & Malone, 2017).

Debido a la gran demanda de producción agrícola se están llevando a cabo prácticas abusivas en el uso de fertilizantes y pesticidas químicos, resultando en una degradación del suelo y en una pérdida de biodiversidad (Jacobsen & Hjelmsø, 2014). Es por esta razón que debería ocurrir un cambio de pensamiento global que lleve a políticas más ecológicas que refuercen la investigación y el uso de inoculantes naturales. Para ello se requiere tener un conocimiento más preciso de todas las interacciones que ocurren en la rizosfera, ya que es importante tener en cuenta que la introducción de microorganismos exógenos al ecosistema requiere tener un profundo conocimiento sobre las consecuencias que esto pueda acarrear a las poblaciones endémicas. Actualmente, la mayor limitación de los inoculantes bacterianos es la supervivencia de estos microorganismos una vez introducidos en el suelo, ya que deben competir con el resto de organismos allí presentes por los nutrientes. A pesar de ello, en la actualidad se están desarrollando nuevas formulaciones que prometen un mayor éxito (Goljanian-Tabrizi *et al.*, 2016, Moreira Fda *et al.*, 2016, De Gregorio *et al.*, 2017, Lally *et al.*, 2017, Santiago *et al.*, 2017).

2.2 Colonización de la rizosfera por las PGPRs

Para que las PGPRs puedan ejercer su acción es imprescindible que ocurra una eficiente colonización del sistema radicular de la planta hospedadora (Lugtenberg & Kamilova, 2009). De hecho, se ha comprobado que la colonización de la raíz es necesaria

para que se puedan llevar a cabo determinados mecanismos de biocontrol, como los que están mediados por antibiosis o competición por nutrientes y nichos (Pliego *et al.*, 2007). Para que se establezca una asociación mutualista exitosa es necesario que ambos organismos respondan a señales recíprocas y acuerden sus respuestas como prioritarias en el desarrollo de un estilo de vida que les genere beneficios mutuos. Por ejemplo, ha sido muy estudiado en el caso de las interacciones de micorrizas y de rizobios simbioses con las plantas, en las que durante las primeras fases de la colonización la planta secreta estrigolactonas (hormonas que inhiben ramificación) y flavonoides que generan la activación de genes involucrados en la señalización de las rutas de la simbiosis por parte de estos microorganismos (Oldroyd, 2013). Sin embargo, está menos estudiado como las PGPRs de vida libre establecen una prolongada interacción mutualista con las raíces, aunque en los últimos años se están produciendo avances en el descubrimiento del diálogo molecular entre estas. Por ejemplo, muchas PGPRs de vida libre responden activamente a los exudados radiculares ajustando su programa transcripcional hacia mecanismos involucrados en quimiotaxis, colonización de la raíz y cambios metabólicos tales como la adaptación a la presencia de exudados tóxicos mediante la inducción de bombas de extrusión o la adecuación a la utilización de los exudados como fuente de carbono y nitrógeno (Matilla *et al.*, 2007, Fan *et al.*, 2012, Neal & Ton, 2013). Se sabe que cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Trichoderma* inician un programa de desarrollo de las raíces dependiente de auxinas, resultando en un aumento de la formación de las raíces laterales, incrementando la longitud de los pelos radiculares y aumentando la producción de biomasa de la planta, disponiendo así de mayor superficie que colonizar en la raíz (Ortiz-Castro *et al.*, 2011, Zamioudis *et al.*, 2013, Contreras-Cornejo *et al.*, 2016).

Una vez que se establecen en la epidermis de la raíz, las PGPRs epifitas normalmente forman biopelículas, comunidad multicelular embebida en una matriz extracelular de polímeros que secretan ellas mismas. Esta matriz está formada principalmente por exopolisacáridos (EPS). En el caso de *Bacillus subtilis*, la formación de biopelículas es esencial para la colonización de las raíces, jugando un papel fundamental la planta en esta interacción, ya que los EPS de la pared de las células radiculares funcionan como molécula señal para la expresión de genes bacterianos involucrados en la producción de la matriz extracelular (Beauregard *et al.*, 2013). Conceptualmente, esta matriz de EPS podría considerarse como la interfase para el intercambio de solutos y sustancias químicas entre planta y microorganismos. Pero en el caso de algunas pseudomonas, como se explicará más

adelante, la formación de biopelículas no es esencial, colonizando la raíz en forma de microcolonias, que ocupan las juntas entre células epidérmicas y están rodeadas de un mucílago de origen vegetal (Barahona *et al.*, 2010). Por tanto, diferentes cepas bacterianas tienen distintos modos de disposición en las raíces, que puede incluso variar en función del tipo de planta que se esté colonizando (Poonguzhali *et al.*, 2008). No obstante, lo que sí parece una característica común a todas las PGPRs es la falta de homogeneidad a la hora de establecerse en la rizosfera. Se ha observado que tienden a colonizar las zonas de la raíz donde se acumulan las rizodeposiciones. (Rudrappa *et al.*, 2008). Por otra parte, las PGPRs endófitas suelen entrar al interior de la raíz a través de heridas producidas por la emergencia de las raíces laterales o a través de los pelos radiculares y la zona apical. Esta entrada es posible gracias a enzimas que degradan la pared celular, como celulasas y pectinasas (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011).

Queda por tanto establecido que las etapas en el proceso de colonización por parte de las PGPRs siguen un orden definido; reconocimiento, adherencia, invasión en el caso de las endofíticas, crecimiento y el establecimiento de diferentes estrategias que les permita perdurar en el tiempo en la interacción mutualista. Aunque la colonización de la rizosfera es en sí un mecanismo muy complejo debido a las múltiples interacciones que ocurren entre los organismos que en ella se establecen y a las características específicas del suelo, se están llevando a cabo numerosos estudios acerca de este proceso esencial para poder utilizar las PGPRs como inoculantes tanto en técnicas agrícolas como de medioambiente y son las pseudomonas, por su gran versatilidad metabólica, los organismos modelo en el estudio de estos procesos (Lugtenberg *et al.*, 2001).

2.3 Las Pseudomonas fluorescentes como PGPRs

Muchas de las especies que incluye el grupo de las pseudomonas fluorescentes han sido descritas como excelentes fitoestimuladores al contar en su genoma con algunas de las siguientes cualidades: (i) la producción de metabolitos secundarios con actividad antibiótica y antifúngica como el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) o una amplia variedad de sideróforos, como la pioverdina, (ii) ser capaces de utilizar el nitrato como aceptor de electrones alternativo y por tanto realizar el proceso de desnitrificación (iii) la producción de toxinas

capaces de eliminar insectos patogénicos de plantas (iv) la interacción con la planta a través de la producción de fitohormonas, principalmente auxinas, que promueven el crecimiento de las raíces que incrementa tanto la captación de minerales por parte de la planta como la cantidad de exudados, haciendo beneficiosa la interacción (Garrido-Sanz *et al.*, 2016). De hecho, algunas de las más importantes enfermedades causadas por bacterias y hongos fitopatógenos son suprimidas de forma efectiva por miembros del grupo de las pseudomonas fluorescentes (Mauchline & Malone, 2017). Entre estas enfermedades se incluyen la llamada “fuego bacteriano”, del inglés *fire blight*, enfermedad causada por la bacteria fitopatógena *Erwinia amylovora* y que afecta sobre todo a frutales (Stockwell *et al.*, 2010), la conocida como “roña o sarna común de la patata” (*potato scab*) producida por *Streptomyces scabies* (Arseneault *et al.*, 2013) y la causada por el hongo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, que afecta a muchas variedades de trigo y cebada (Yang *et al.*, 2011). Además, ha sido descrito en varias especies de este grupo la capacidad de biodegradar compuestos recalcitrantes, combatiendo la contaminación de metales pesados y pesticidas de forma natural (Wasi *et al.*, 2013).

3. El género *Pseudomonas* y *Pseudomonas fluorescens* F113

La familia *Pseudomonadaceae*, perteneciente a la clase de las γ -proteobacterias, fue descrita a principios del siglo XX, englobando al establecido como género *Pseudomonas* en la actualidad y a un gran número de géneros dispares entre sí que con el tiempo se han ido reclasificando. El género *Pseudomonas* es uno de los más complejos y diversos, con más de 100 especies descritas hasta la fecha (Parte, 2014). Sus miembros se caracterizan fundamentalmente por ser microorganismos saprófitos de vida libre, aunque también los encontramos asociados a plantas y animales como agentes patogénicos, (Valentini *et al.*, 2017, Wei & Collmer, 2017) y por ser gram negativos, con forma de bacilos rectos o ligeramente curvados que tienen un tamaño cuyo diámetro oscila entre 0.5-1 μm y una longitud muy variable, desde 1 μm hasta 5 μm .

Dentro de esta familia se incluye el grupo de las pseudomonas fluorescentes, que deben su nombre a la producción de pigmentos verdes amarillentos que fluorescen cuando

son excitados a bajas longitudes de onda. Algunas de las especies representativas de este grupo son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fluorescens*, aunque más de 50 especies han sido validadas como pertenecientes al grupo (Gomila *et al.*, 2015). Su genoma es muy complejo, codificando más de 6000 genes, con mucha diversidad intraespecífica y con muchos genes codificantes para sistemas de transducción y metabolismo secundario (Loper *et al.*, 2012, Garrido-Sanz *et al.*, 2016). Todos sus miembros son móviles al presentar uno o más flagelos polares, quimioorganotrofos y aeróbicos, aunque en ciertos casos pueden usar el nitrato y otros óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones alternativos, permitiéndoles tener actividad metabólica en condiciones de anaerobiosis o microaerobiósis (Vander Wauven *et al.*, 1984, Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Además, son microorganismos no esporulantes, no presentan vainas ni apéndices a excepción de los flagelos y fimbrias de diversos tipos, tienen actividad catalasa positiva y un contenido en pares de bases GC del 58/69% (Palleroni, 2008). Una de sus principales características es su gran versatilidad metabólica, ya que son capaces de utilizar diversos compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, por lo que pueden establecerse en diversos ambientes, siendo algunos patógenos oportunistas de humanos como *P. aeruginosa* o de plantas como *P. syringae*, mientras que otros son considerados PGPRs al ejercer efectos beneficiosos en las plantas. Algunas de las pseudomonas fluorescentes descritas como PGPRs son *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas protegens*, *Pseudomonas chlororaphis* y *P. fluorescens*. Se han identificado diversos mecanismos de acción mediante los cuales desempeñan su función como PGPRs, una competente colonización de la rizosfera, la producción de antibióticos o fitohormonas e incluso por la inducción de la respuesta sistémica de las plantas, características que hacen que sean cepas modelo para ser utilizadas en procesos de biocontrol y biofertilización (Capdevila *et al.*, 2004, Haas & Defago, 2005, Bakker *et al.*, 2007, Weller, 2007, Raaijmakers *et al.*, 2010).

Pseudomonas fluorescens F113 pertenece al grupo de las pseudomonas fluorescentes y al subgrupo corrugata (Garrido-Sanz *et al.*, 2016), situándose filogenéticamente muy cerca de *Pseudomonas kilonensis* (Almario *et al.*, 2017). Fue aislada de la rizosfera de remolacha (*Beta vulgaris*) en Irlanda y produce metabolitos con actividad antibiótica y antifúngica como son el ácido cianhídrico (HCN), o el DAPG (Shanahan *et al.*, 1992). En concreto, se ha demostrado una gran eficacia del DAPG frente a enfermedades

producidas por hongos fitopatógenos, como son las enfermedades *black root-rot* en tabaco (Keel et al, 1992) y *damping-off* en la remolacha (Fenton et al., 1992). Ha sido también descrita por parte de *P. fluorescens* F113 la síntesis de estructuras y compuestos implicados en su función como PGPR, como son: (i) sistemas de secreción, (ii) pioverdina, sideróforo para la captación de hierro del medio; y (iii) ACC deaminasa, enzima que degrada el precursor del etileno ACC, (Moenne-Loccoz et al., 2001, Couillerot et al., 2009). Además, es una colonizadora competente de varias plantas de interés agrícola, como son el guisante (*Pisum sativum*) (Naseby & Lynch, 1999), el tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Simons et al., 1996), la alfalfa (*Medicago sativa*) (Villacieros et al 2003) y la fresa (Barahona et al., 2011). De hecho, se han realizado liberaciones voluntarias de esta cepa al medio natural (Möenne-Loccoz et al., 2001). Además, se han realizado cepas modificadas genéticamente derivadas de *P. fluorescens* F113 que contienen los genes *bph* integrados en el cromosoma, permitiéndole metabolizar algunos bifenilos policlorados (PCBs) (Karlson et al., 1998, Brazil et al., 1995, Villacieros et al., 2005) (Karlson et al 1998) y se han analizado los posibles impactos ambientales que pudiera ocasionar en las comunidades microbianas autóctonas del suelo y la rizosfera en sistemas integrados planta/microorganismo (de Cárcer et al., 2007a, de Cárcer et al., 2007b).

Otra adaptación metabólica de *P. fluorescens* F113 es la degradación de compuestos aromáticos como los diterpenos, resinas ácidas segregadas por las plantas, ya que en su genoma están presentes los genes *dit*. Se ha comprobado que son funcionales, permitiéndole crecer con diterpenos como única fuente de carbono y energía (Redondo-Nieto et al., 2013). Este gen ha sido identificado en varias pseudomonas y otras proteobacterias como *Burkholderia* y *Cupriavidus* (Witzig et al., 2007). La secuencia del genoma de *P. fluorecens* F113 (Redondo-Nieto et al., 2013) ha mostrado que esta bacteria es más similar a *P. brassicacearum* NFM421 que a otras estirpes pertenecientes al grupo de las pseudomonas fluorescentes previamente secuenciadas como son *P. fluroescens* Pf0-1, *P. fluroescens* Pf5 o *P. fluroescens* SBW25.

Otros factores importantes para una eficaz colonización de la rizosfera presentes en *P. fluorescens* F113 se irán describiendo en los siguientes apartados.

4. Factores implicados en la colonización de la rizosfera

Para que un organismo sea utilizado como PGPR debe cumplir ciertos requisitos, entre los que destaca realizar una competente colonización de la rizosfera (Lugtenberg & Kamilova, 2009). Las pseudomonas fluorescentes son capaces de colonizar toda la superficie de las plantas (Espinosa-Urgel, 2004) y en concreto las cepas pertenecientes a la especie *P. fluorescens* están adaptadas a sobrevivir en el suelo y a colonizar su rizosfera (Kiely *et al.*, 2006, Garrido-Sanz *et al.*, 2017).

La colonización de la rizosfera por parte de las pseudomonas lleva años estudiándose. Es un complejo proceso altamente controlado que comienza con procesos de movilidad quimiotáctica hacia los exudados radiculares seguido de asociación a superficies y migración por el rizoplasma, etapas mediadas por la movilidad dependiente de flagelos y de pili tipo IV, así como por la producción de biosurfactantes (Lugtenberg *et al.*, 2001). Las últimas etapas de la colonización de la raíz implican la formación de microcolonias en la superficie de la misma con la posibilidad de un posterior desarrollo de biopelículas maduras, donde se establecen como comunidad asociada a la raíz (Chin-A-Woeng *et al.*, 1997, Barahona *et al.*, 2010, Alsohim *et al.*, 2014). Durante este proceso las bacterias sintetizan una matriz extracelular que está formada por diferentes tipos de adhesinas y exopolisacáridos, aunque la matriz también contiene componentes vegetales (Gal *et al.*, 2003, Hinsä *et al.*, 2003, de Weert *et al.*, 2006). Se han desarrollado trabajos muy exhaustivos en los que describen el proceso de colonización de la rizosfera por cepas de pseudomonas. Por ejemplo, la cepa con capacidad de biocontrol *P. fluorescens* WCS365 se caracteriza por formar microcolonias, principalmente en la base de la raíz de tomate en las primeras horas de colonización. La mayor parte de estos agregados se concentran entre las células epidérmicas radiculares, y en menor número en la superficie de éstas, envueltas en mucílago secretado por la planta (Chin-A-Woeng y col., 1997). Este patrón de colonización espacio temporal, con ápices radiculares desprovistos de bacterias se ha observado también en otras especies de *P. fluorescens*, incluyendo a *P. fluorescens* F113 (Barahona *et al.*, 2010), como se observa en la figura 1.2. Por el contrario, otras cepas de pseudomonas, pueden utilizar estrategias diferentes en la colonización de la rizosfera (Pliego *et al.*, 2008)

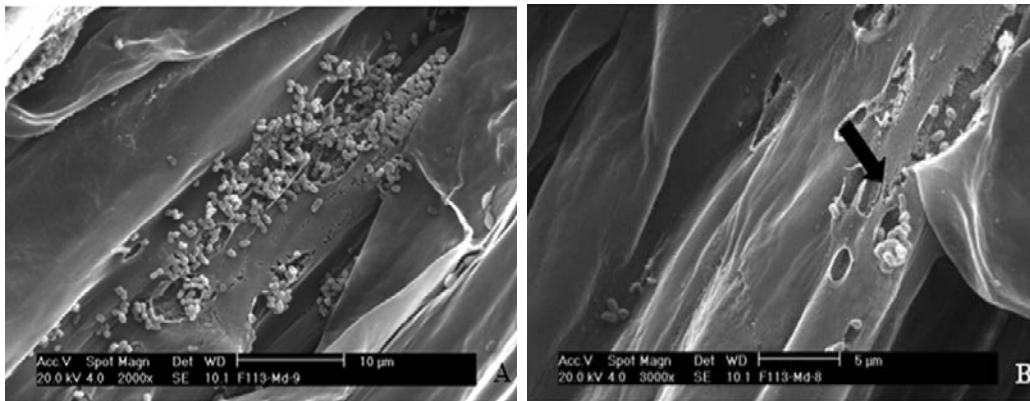


Figura 1.2: Colonización de la rizosfera por *P. fluorescens* F113. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido. Se pueden observar las células aisladas o formando microcolonias en la superficie de la raíz de alfalfa (*Medicago sativa*). A y B muestran diferentes aumentos. Imagen obtenida de (Barahona *et al.*, 2010).

Pero el proceso de colonización en sí no es suficiente para poder utilizar a un microorganismo como PGPR, es necesario que la interacción mutualista establecida perdure en el tiempo. Las rizobacterias han desarrollado por tanto estrategias de supervivencia en la interacción planta-microorganismo debido a que, en la rizosfera, los microorganismos están sometidos a un continuo ataque por parte de otros miembros de este ecosistema, como por ejemplo la depredación por parte de nematodos e insectos o la competición por nicho con otros microorganismos. Para evitar ser predadas muchas pseudomonas producen toxinas con actividad insecticida, como son Mcf, IPD072Aa o la toxina Fit (Pechy-Tarr *et al.*, 2008). También secretan bacteriocinas y otros productos naturales para competir con otras bacterias, oomicetos y hongos, como por ejemplo los numerosos metabolitos sintetizados por *P. brassicacerarum* que afectan al hongo *Microdochium nivale* y por ende controla la enfermedad que éste produce en trigo (*pink snow mould*) (Andersson *et al.*, 2012). Además de la secreción de estas moléculas para competir con otros organismos presentes en la rizosfera, algunas pseudomonas fluorescentes también tienen la habilidad de producir lactonas capaces de suprimir las señales de QS de otros microorganismos (Jafrá *et al.*, 2006) y gran variedad de productos naturales con diversas funciones, como es la antibiótica, que matan o suprimen a otros organismos, tanto fitopatógenos como competidores por el nicho (Haas & Defago, 2005, Loper *et al.*, 2012). Dentro de estos productos naturales podemos incluir a los sideróforos, compuestos quelantes de metales que también inhiben a patógenos al hacerlos no disponibles para ellos (Kloepper *et al.*, 1989). Estos sideróforos son

producidos por prácticamente todas las pseudomonas fluorescentes y, de hecho, les deben su nombre, ya que suelen ser moléculas que generan fluorescencia cuando son excitados a bajas longitudes de onda. También se ha observado que muchas cepas pertenecientes a este grupo codifican compuestos y enzimas que promueven el crecimiento de las raíces tales como, auxinas, compuestos volátiles como la 3 hidroxibutanona o el 2,3 butanodiol junto con enzimas como la ACC daminasa que protege a la planta del estrés ambiental reduciendo la producción de etileno (Ryu & Patten, 2008, Loper *et al.*, 2012, Garrido-Sanz *et al.*, 2017). El hecho de inducir el crecimiento radicular permite a las bacterias aumentar su nicho ecológico.

Todas estas moléculas son secretadas por los sistemas de secreción bacterianos. Existen diferentes tipos de estos complejos sistemas proteicos, agrupados en seis familias conocidas como factores de secreción tipo I-VI. Hasta la fecha se ha demostrado que solamente los factores de secreción tipo III, IV y VI son capaces de secretar moléculas en el citoplasma de otras células, mientras que los de tipo I, II y V secretan moléculas en el interior del periplasma o al espacio extracelular, pero no alcanzan el interior celular (Walker *et al.*, 2017). En el caso de las pseudomonas fluorescentes se han descrito factores de secreción tipo III, tipo IV y tipo VI encargados de inyectar toxinas, otras proteínas efectoras e incluso ácidos nucleicos tanto en células eucariotas como procariotas y que contribuyen a fenotipos virulentos (Mazurier *et al.*, 2015, Gallique *et al.*, 2017). Por otro lado, el factor de secreción tipo II incluye diversos tipos de proteínas exportadoras, facilitando la secreción de bacteriocinas, adhesinas y otras enzimas extracelulares (Hinsa *et al.*, 2003).

En el genoma de *P. fluorescens* F113 se han identificado los genes codificantes para todos los factores de secreción, teniendo además varias versiones o copias de cada uno de ellos. Concretamente presenta los genes que codifican para seis tipos de factores de secreción tipo I, dos para el sistema de secreción tipo II: Xcp y Hxc, otros dos para el sistema de secreción tipo III: SPH-1 y Hrp-1, un único sistema de secreción tipo IV, dos versiones de los sistemas de secreción tipo V, a y b, y tres sistemas de secreción tipo VI, I, II y IVA (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Esta amplia gama de factores de secreción sugiere la ganancia de ventajas adaptativas y competencia por parte de esta cepa en el proceso de colonización de la rizosfera. *P. fluorescens* F113 es una cepa modelo en estudios de biocontrol por su gran capacidad de inhibición del crecimiento de gran variedad de bacterias, hongos,

oomicetos y nematodos, incluyendo a *Pectobacterium caratovorum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum* y *Globodera* spp. (Fenton *et al.*, 1992, Cronin *et al.*, 1997a, Barahona *et al.*, 2011).

Gracias a la secuenciación de su genoma hemos conocido que codifica para otros muchos factores importantes en una eficiente colonización de la rizosfera y para perdurar en ella en interacción con las plantas (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Una de estas características es la capacidad de utilizar los óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones alternativo al oxígeno, permitiéndole crecer en condiciones de anaerobiosis o microanaerobiosis. Ha sido demostrado que este proceso, denominado desnitrificación, juega un importante papel en la colonización competente de la rizosfera (Jones *et al.*, 2011). Concretamente, *P. fluorescens* F113 posee en su genoma los genes codificantes para aproximadamente 50 proteínas relacionadas con este proceso. Están organizadas en cuatro clústeres y presentan alta homología con genes codificantes en otras pseudomonas (Redondo-Nieto *et al.*, 2013), aunque muestran una inusual organización con un juego de genes *nar* y *nir*, que codifican para nitrato y nitrito reductasas, respectivamente, así como dos series de genes *nor* y *nos*, que codifican para óxido nítrico y óxido nitroso reductasas, respectivamente (Fig. 1.3).

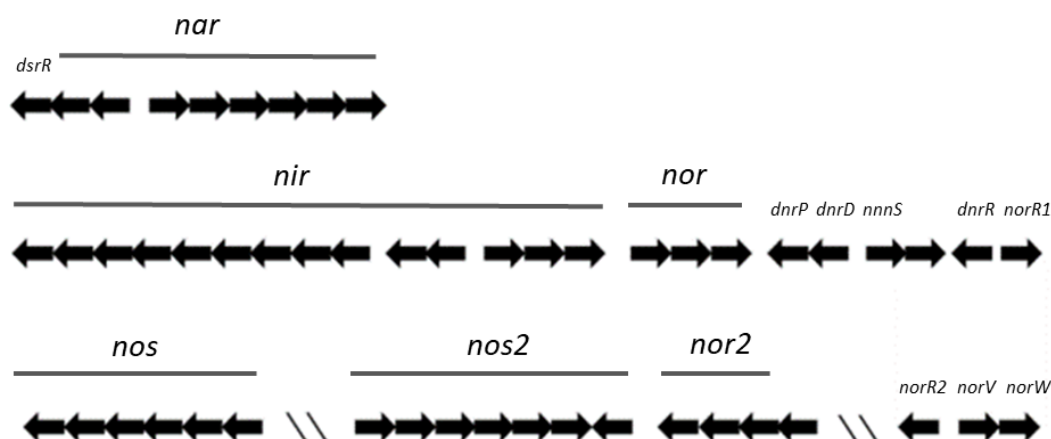


Figura 1.3: Organización genética de los genes de desnitrificación en *P. fluorescens* F113. Se localizan en cuatro clústeres diferentes. Un primer clúster contiene los genes *nar* que codifican para el enzima nitrato reductasa, mientras que el segundo clúster incluye los genes *nir* y *nor*, codificantes para los enzimas nitrito reductasa y óxido nítrico reductasa, respectivamente. Un tercer clúster presenta los genes *nos* que codifican para el enzima óxido nitroso reductasa más un último cluster que contiene versiones de los genes *nos* y *nor*. Tanto el regulador de respuesta NarL-NarX como el regulador transcripcional DnrS están codificados aguas arriba de los genes *nar*. Imagen modificada de (Redondo-Nieto *et al.*, 2013).

Ha sido demostrado que *P. fluorescens* F113 realiza el proceso de desnitrificación de manera completa, siendo capaz de crecer en condiciones de anaerobiosis utilizando tanto nitrato como nitrito como aceptores de electrones alternativos y efectuando una total eliminación del nitrito en el medio (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Así como que es capaz de realizar movilidad dependiente de flagelos en condiciones de anaerobiosis utilizando nitrato como aceptor de electrones alternativo (Muriel *et al.*, 2015). La presencia de dos copias de los genes *nos* y *nor* podrían estar relacionados con altas tasas de desnitrificación, como ha sido observado en cepas de *Bacillus* (Jones *et al.*, 2011).

Por otro lado, en lo que se refiere a factores asociados a la virulencia y cualidades relacionadas con la competencia por el nicho, ya hemos visto que las pseudomonas fluorescentes producen numerosos metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas para competir y sobrevivir en la rizosfera. *P. fluorescens* F113 codifica en su genoma para dos sideróforos diferentes, la pioverdina y el ácido 2,6-piridincarbético (PDTC) (Lewis *et al.*, 2004, Croning *et al.*, 1997b) y produce compuestos antimicrobianos de amplio espectro como son el DAPG y el HCN (Fenton *et al.*, 1992, Aarons *et al.*, 2000). Además, han sido identificados en el genoma de *P. fluorescens* F113 genes que codifican toxinas y factores de virulencia, como varias hemolisinas, hemaglutininas, adhesinas y dos toxinas del tipo RTX (Redondo-Nieto *et al.*, 2013), así como otras dos toxinas específicas de insectos cuya función ya ha sido demostrada en cepas de pseudomonas y en la entereobacteria patógena de animales *Yersinia enterocolitica* (Tennant *et al.*, 2005). También se ha determinado la presencia de un clúster que codifica para proteínas involucradas en la síntesis de un antibiótico, similar a la lankacidina. Este clúster no está presente en más pseudomonas, teniendo homología con un macrólido de *Streptomyces rochei* (Suwa *et al.*, 2000).

4.1 Movilidad y Quimiotaxis

Numerosos estudios han confirmado que la movilidad es un factor esencial para la colonización de la rizosfera, tanto para microorganismos patógenos como beneficiosos (Dutta & Podile, 2010), ya que es necesario que el microorganismo de vida libre se dirija hacia la raíz. Para colonizar una superficie o nuevos ambientes, las bacterias utilizan diferentes apéndices celulares, como los flagelos, y pueden desempeñar distintos tipos de

movilidad denominadas: (i) *swimming* (ii) *swarming*, (iii) *twitching* y (iv) *gliding*. De estos movimientos solo los dos primeros son dependientes de flagelo, definiéndose la movilidad tipo *swimming* como el movimiento de células individuales en un medio líquido de baja viscosidad. Este movimiento se observa en placas con baja concentración de agar como halos concéntricos (Keller & Rubinow, 1976). Por el contrario, la movilidad tipo *swarming* es un movimiento multicelular coordinado de las bacterias sobre superficies semi-sólidas, en el que las células sufren un proceso de diferenciación morfológica, convirtiéndose en células especializadas, que pueden ser hiperflageladas, y generalmente más alargadas, donde juegan un importante papel los surfactantes y ramnolípidos (Harshey, 2003). Este movimiento da lugar a patrones dendríticos en la superficie del agar. En enterobacterias el movimiento tipo *swimming* es dependiente de flagelos polares, mientras que el *swarming* lo es de los flagelos peritricos. Sin embargo, al no existir estos flagelos laterales en las pseudomonas, ambos movimientos se producen a través de los flagelos polares.

La movilidad es quimiotáctica, es decir, depende del proceso quimiotáctico por el cual las bacterias son capaces de responder de manera eficiente y rápida a cambios en la composición físico-química de su ambiente, dirigiéndose hacia ambientes favorables y escapando de los desfavorables (Bren & Eisenbach, 2000). Este proceso es esencial para una efectiva colonización de la raíces y competencia por el nicho con el resto de microorganismos (de Weert *et al.*, 2002). Además, las flagelinas, proteínas estructurales del flagelo, juegan un importante papel en el reconocimiento de las bacterias por parte de la planta, siendo también de gran importancia durante las primeras etapas de la colonización de una superficie (Che *et al.*, 2000, Parker, 2003, Shimizu *et al.*, 2003, Katsuragi *et al.*, 2015).

4.1.1 Movilidad dependiente de flagelo: estructura y regulación flagelar

Fue hace más de 300 años, con la aparición de los primeros microscopios, cuando Antonie van Leeuwenhoek observó que las bacterias eran organismos móviles. Esta movilidad estaba ligada a la presencia de orgánulos filamentosos a los que se les denominó flagelos. Los flagelos son apéndices celulares más o menos largos y finos, de unos 20 nm de diámetro que se encuentran anclados a la célula por uno de sus extremos. Su disposición varía según la especie bacteriana y puede clasificarse en polar o lateral, aunque ambos

presentan la misma estructura. En la actualidad sabemos que gracias a adaptaciones como los flagelos y el proceso quimiotáctico las bacterias son capaces de moverse hacia lugares que presenten condiciones favorables para su supervivencia. Sin embargo, durante algunos años permaneció la controversia de si la presencia del flagelo era indispensable para que las bacterias realicen una colonización eficaz de la rizosfera (Howie et al, 1987; Scher et al, 1988). Fue con el trabajo de de Weger y colaboradores realizado con mutantes inmóviles de *P. fluorescens* WCS374, incapaces de realizar una colonización competente, cuando se asumió que la movilidad dependiente de flagelo juega un papel esencial en el proceso de la colonización de la rizosfera (de Weger et al., 1987). Hoy sabemos, que además de ser esencial para la movilidad bacteriana, el flagelo está implicado en otros procesos como la adherencia a superficies, la formación de biopelículas o la interacción con otros organismos (Pratt & Kolter, 1998, Young et al., 1999).

El flagelo es una de las estructuras más complejas presentes en los procariotas y está constituido por más de 30 proteínas diferentes. Su estructura, aunque puede variar de unos organismos a otros, se compone de tres partes principales: el cuerpo basal, el gancho y el filamento (Macnab, 2003) (Figura 1.4). El cuerpo basal se encuentra embebido en la membrana citoplasmática y en la pared celular, actuando como región de anclaje a la célula. Se encarga de la rotación del filamento actuando como un motor de rotación reversible y de la exportación del resto de proteínas flagelares gracias a un especializado sistema de secreción tipo III (Minamino & Namba, 2004). En Gram negativas, el cuerpo basal está formado por diferentes estructuras: (i) dos anillos exteriores que se denominan L y P y están relacionados, respectivamente, con la membrana externa y con el peptidoglicano, (ii) los anillos M y S, localizados en la membrana interna y el espacio periplásmico, respectivamente, (iii) el anillo C, o citoplasmático, en el que se encuentran las proteínas FlhG, FlhM y FlhN formando parte del motor flagelar, (iiii) las proteínas integrales de membrana MotA y MotB, que se localizan rodeando al resto de estructuras y también forman parte del motor flagelar y (iv) el eje o hueco interior formado por los anillos MS y C donde se alojan una serie de proteínas implicadas en la secreción de los componentes del flagelo (Figura 1.4).

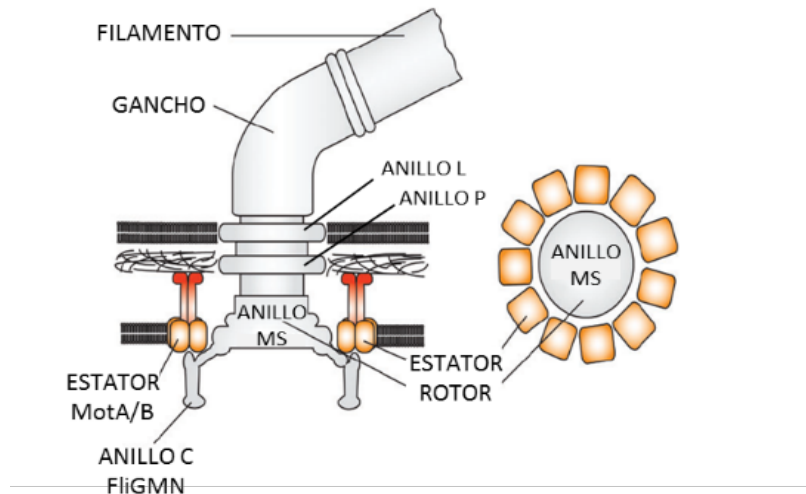


Figura 1.4: Esquema simplificado de la estructura del flagelo bacteriano. Modificado de (Thormann & Paulick, 2010)

Dentro del cuerpo basal se encuentra por tanto el motor flagelar, que a su vez puede dividirse en dos partes: estator y rotor. El estator está formado por canales para el paso de iones a través de la membrana, y es el responsable de la generación de la energía mecánica para la rotación del motor del flagelo (Berg, 2003). Está formado por varias copias de las proteínas MotA y MotB. Por otro lado, el rotor o parte móvil, está constituido por algunas de las proteínas Fli, siendo FliG junto a las proteínas Mot las responsables de generar la fuerza de torsión necesaria para el cambio en la dirección de rotación del flagelo (Lloyd *et al.*, 1996). El gancho es una estructura curvada de 55 nm de longitud, y 22 nm de diámetro, que conecta el filamento al corpúsculo basal. Está formado por monómeros de la proteína FlgE, dispuestos en alfa-hélices, lo que permite que actúe como una bisagra flexible que transmite la fuerza de torsión generada por el motor hacia el filamento e impulsar a la célula (Ferris & Minamino, 2006). Por último, el filamento es una estructura helicoidal de unos 20nm de diámetro y longitud variable compuesta por hasta 30.000 subunidades de flagelina (FliC) y que presenta en su extremo distal la denominada proteína final, formada por cinco monómeros de la proteína FliD (Macnab, 2003).

Debido a su compleja estructura y a su función, dignas de una obra de ingeniería, la biosíntesis del flagelo es un proceso energéticamente muy costoso para la célula. Se ha descrito que en torno a un 2% de la energía obtenida por *Escherichia coli* es utilizada sólo

en su biosíntesis (Macnab, 2003). En el proceso de biosíntesis del flagelo interviene la expresión de más de 50 genes de manera jerarquizada (Thormann & Paulick, 2010), que a su vez están regulados por factores ambientales, como pueden ser señales de QS, disponibilidad de nutrientes o temperatura (Appelt & Heuner, 2017). Este proceso se conoce relativamente bien en *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Macnab, 2003, McCarter, 2006), produciendo ambas, flagelos peritricos. En estas especies, los genes implicados en la producción del flagelo se separan en tres clases en función de su regulación y del momento en el que se expresan. En cambio, en pseudomonas y otras gram negativas, la regulación del filamento flagelar parece presentar cuatro niveles de regulación jerárquica. En todas las bacterias existe una relación entre la producción de los componentes estructurales del flagelo y su ensamblaje, resultando en un proceso extremadamente ordenado en las etapas de síntesis, incorporación, exportación y ensamblaje de sus componentes (McCarter, 2006). Aunque existen diferencias en la regulación de la expresión de los genes en diferentes especies bacterianas, se pueden clasificar en tres o cuatro niveles diferentes en función del momento en el que se expresan. Dentro de las pseudomonas, es en *P. aeruginosa* donde más se ha estudiado el proceso de biosíntesis del flagelo, ya que se ha demostrado que los flagelos juegan un importante papel en la virulencia (Arora *et al.*, 1998). En esta cepa, los genes flagelares se encuentran localizado en tres regiones no contiguas del genoma y se pueden clasificar en cuatro grupos según el orden en el que se expresan: genes de clase I, clase II, clase III y clase IV (Dasgupta *et al.*, 2003).

Los genes pertenecientes a la clase I son los primeros en expresarse y de ellos depende la expresión del resto. Dentro de esta clase I encontramos el gen que codifica la proteína FleQ, considerada como la reguladora principal de la síntesis del flagelo en pseudomonas (Arora *et al.*, 1997), y que junto con el factor sigma RpoN o σ^{54} y al gen *fliA* son los responsables de la expresión, de manera directa o indirecta, del resto de genes flagelares (Jyot *et al.*, 2002, Dasgupta *et al.*, 2003). La expresión de FleQ es dependiente del factor sigma σ^{70} y está reprimida por AlgU o σ^{22} , Vfr y AmrZ (Tart *et al.*, 2005, Tart *et al.*, 2006, Martinez-Granero *et al.*, 2012). Los promotores de los genes *fleQ* y *fliA* están regulados por factores ambientales e incluso parecen estar de alguna manera influenciados por interrupciones en la biosíntesis del propio flagelo (Dasgupta *et al.*, 2002). Por otra parte, no se conoce muy bien cómo se regula la expresión de *fliA*, ya que parece ser independiente de todos los factores σ estudiados (Dasgupta *et al.*, 2003), aunque en *Legionella*

pneumophila parece que FleQ es el encargado de aumentar sus niveles de expresión junto a la acumulación de una alarmona (ppGpp) en el interior celular, pero sus niveles de expresión basales no dependen de ellos, si no al igual que FleQ, del factor sigma σ^{70} (Schulz *et al.*, 2012).

Los genes de la clase II codifican algunos componentes estructurales del flagelo que dan lugar al cuerpo basal, al anillo MS, al motor, al aparato de exportación flagelar y al extremo del filamento. Todos ellos están regulados directamente por FleQ y RpoN de manera positiva. Además, dentro de este grupo se incluyen proteínas reguladoras que dan lugar a un único mRNA bicistrónico. Dentro de estas proteínas reguladoras cabe destacar a FlhF que es la responsable de la localización del flagelo en posición polar (Pandza *et al.*, 2000, Murray & Kazmierczak, 2006) y a FleN, proteína que reprime a nivel post-traducciona la actividad de FleQ por unión directa, y parece jugar un papel muy importante en la regulación del número de flagelos sintetizados en la célula (Dasgupta & Ramphal, 2001). También se encuentran dentro de estas proteínas reguladoras el sistema de dos componentes FleS/R encargado de la transición en la expresión de los genes de la clase II a los de clase III. Por otra parte, FliA es la responsable de la transcripción de FlgM, que a su vez se une a FliA, inhibiendo que active la transcripción de los genes de clase IV.

Los genes de la clase III codifican proteínas estructurales y para el ensamblaje del cuerpo basal y el gancho (Hirano *et al.*, 2001). Todos los genes pertenecientes a esta clase requieren la expresión de FleQ, RpoN y FleS/R. Cuando la estructura del cuerpo basal y el gancho están ensamblada, FlgM es secretado a través de él, dejando libre a FliA y permitiendo la transcripción de los genes de clase IV.

Dentro de los genes de clase IV encontramos a la flagelina, proteína estructural del filamento, genes responsables de la rotación del motor (*motA/B*) y genes involucrados en el proceso de quimiotaxis.

En resumen, la biosíntesis del flagelo en *pseudomonas* o en cualquier otra especie bacteriana, está controlado por un gran número de genes reguladores y requiere la expresión de un alto número de genes estructurales. Además, se ha descrito que la activación de los genes de clase II y III está regulada negativamente por el segundo

mensajero (3'→5') digunosin monofosfato cíclico (c-di-GMP) que se une a FleQ inhibiendo su actividad como factor transcripcional de los genes relacionados con la síntesis del filamento flagelar (Baraquet & Harwood, 2013). En estas circunstancias, FleQ es capaz de activar la transcripción de promotores que regulan la formación de biopelículas. De esta forma, FleQ es al mismo tiempo activador y represor de la movilidad en función de los niveles intracelulares de c-di-GMP (Baraquet & Harwood, 2015). Muchos son en los últimos años los estudios que implican a este segundo mensajero, perteneciente a la familia de la alarmonas, en la regulación de la síntesis del aparato flagelar en diferentes puntos del proceso. Se profundizará sobre este segundo mensajero en el apartado 4.4.

Por tanto, la movilidad se encuentra regulada a todos los niveles, a través de alteraciones en la expresión de los genes flagelares, del ensamblaje de sus productos codificantes y de la velocidad de rotación del flagelo ensamblado.

4.1.2 Regulación de la movilidad dependiente de flagelos en *P. fluorescens* F113

Aunque en términos generales la biosíntesis del flagelo es similar para todas las pseudomonas, existen algunas diferencias. En *P. fluorescens* F113 se analizó la organización y regulación de una región genética de 6.5 Kb, localizada entre los genes *fliC* y *fleQ* (Capdevila *et al.*, 2004, Redondo-Nieto *et al.*, 2008). Y se ha descrito que la expresión de la proteína FlaG (FleL en *P. aeruginosa*) y el operón formado por los genes *fliST* (*fliSfleP* en *P. aeruginosa*) no dependen la de expresión de FleQ, ni de cualquier otro factor sigma alternativo, lo que indica que se encuentran en el mismo nivel de *fleQ*, dentro de los genes de clase I. Además, la expresión de *flaG* es completamente independiente a la de *fliC* (Redondo-Nieto *et al.*, 2008).

Además, hasta la fecha se han identificado varias rutas de regulación que reprimen la movilidad dependiente de flagelos en *P. fluorescens* F113 (Navazo *et al.*, 2009, Martinez-Granero *et al.*, 2012, Barahona *et al.*, 2016), como se detalla a continuación.

El sistema de dos componentes GacA/GacS, regula de forma negativa la movilidad a través de la represión de la biosíntesis del flagelo. Este sistema de dos componentes regula

el metabolismo secundario en muchas pseudomonas (de Souza *et al.*, 2003) y también activa la transcripción de varias moléculas de RNA de pequeño tamaño (sRNA), *rsmXYZ* (Kay *et al.*, 2005). A su vez, estos sRNA reprimen la traducción de las proteínas RsmAEI, cuya función es reprimir la transcripción de AlgU (Lapouge *et al.*, 2007, Schubert *et al.*, 2007). AlgU es el factor sigma necesario para la expresión del represor de *fleQ*, AmrZ. Si no hay RmsAEI, se transcribe AlgU, activando a su vez la expresión de AmrZ que reprime al activador transcripcional del primer flagelo, *fleQ*, no sintetizándose este (Navazo *et al.*, 2009, Martinez-Granero *et al.*, 2012) (Fig. 1.5).

Por otra parte, la proteína citoplasmática SadB, caracterizada inicialmente como una proteína implicada en la adhesión a superficies (Caiazza & O'Toole, 2004), posee un dominio HDOD y ha sido sugerida su implicación en relación al metabolismo del segundo mensajero c-di-GMP (Merritt *et al.*, 2007). Esta proteína se encuentra también regulando la movilidad de manera negativa a través de del factor sigma AlgU y, por tanto, mediante AmrZ, reprimiendo al master regulador *fleQ* (Navazo *et al.*, 2009). Ha sido demostrado que tanto el sistema GacA/S como SadB reprimen la movilidad actuando sobre AlgU de manera independiente (Martinez-Granero *et al.*, 2012) (Fig.1.5).

Los sistemas SadC/BifA y Wsp, regulan la movilidad de forma independiente, a través de la función del flagelo, en una ruta que converge a nivel de la proteína FlgZ. Esta proteína, cambia su localización celular en función de los niveles de c-di-GMP. Cuando estos niveles son altos, se localiza en la base del flagelo y podría actuar como un freno. FlgZ parece detectar los niveles de c-di-GMP resultantes de la actividad de los sistemas SadC/BifA y Wsp e interaccionar con el motor del flagelo. Esta ruta de regulación de la movilidad es independiente de las rutas en las que participan el sistema GacA/S y la proteína SadB (Navazo *et al.*, 2009, Martinez-Granero *et al.*, 2014a) (Fig. 1.5).

Además, en el genoma de *P. fluorescens* F113 se han identificado los genes que dan lugar a la formación de un segundo aparato flagelar polar (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Estos genes forman parte de un clúster de 41 kb, localizado en una isla genética, presente solamente en otras seis cepas del género pseudomonas y teniendo gran homología con los genes flagelares de la bacteria *Azotobacter vinelandii* DJ (León & Espin, 2008). La regulación de estos genes se produce a través del master regulador *flhDC*, en vez de *fleQ*, activando su

transcripción la proteína Vfr (Barahona *et al.*, 2016). Aunque el master regulón *flhDC* normalmente sintetiza flagelos peritricos (Poggio *et al.*, 2007), aparte de en *P. fluorescens* F113, ha sido observada la regulación de flagelos polares en *Burkholderia glumae* (Jang *et al.*, 2014). Bajo condiciones de laboratorio este master regulador no se expresa, no produciéndose este segundo aparato flagelar. Es al sobreexpresar ectópicamente *flhDC* cuando se observa un fenotipo hipermovil con células hiperflageladas. También se ha podido observar que los mutantes en los genes *kinB* y *algU* expresan tanto *flhDC* como la flagelina de este segundo flagelo (FliC₂), sugiriendo que tanto *kinB* como *algU* reprimen fuertemente la producción de este segundo aparato flagelar, mediante la represión del master regulador *flhDC* (Barahona *et al.*, 2016). También AmrZ, regulador transcripcional que requiere a AlgU para su transcripción (Martinez-Granero *et al.*, 2014b), está implicado en la regulación negativa de *flhDC*. Ha sido descrito que la proteína AlgU regula la transcripción de *fleQ*, a través de la represión de AmrZ, por lo que en esta cepa AlgU regula simultáneamente la síntesis de ambos flagelos (Martinez-Granero *et al.*, 2012, Barahona *et al.*, 2016) (Fig. 1.5). Ha sido demostrado que la producción de este segundo aparato flagelar es una ventaja adquirida por *P. fluorescens* F113 para realizar una colonización más competente de la rizosfera (Barahona *et al.*, 2016).



Figura 1.5: Rutas de regulación de la movilidad en *P. fluorescens* F113. Este modelo integra los tres niveles de regulación en una compleja red de transducción de señales, en la que las diferentes rutas están interconectadas.

En resumen, la regulación ambiental de la movilidad dependiente de flagelos en *P. fluorescens* F113 está regulada a diferentes niveles, tanto a nivel de la transcripción de importantes reguladores transcripcionales, que a su vez van a reprimir la transcripción de *fleQ*, master regulador de la biosíntesis flagelar, como a través de la regulación la funcionalidad del flagelo, mediante los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP.

4.1.3 Movilidad quimiotáctica

Como ya se ha comentado, la movilidad bacteriana no es un fenómeno aleatorio, sino que está ligado a la movilidad quimiotáctica. El fenómeno de quimiotaxis se define como el movimiento dirigido de las células a través de gradientes químicos y físicos producidos por diferentes sustancias (Porter *et al.*, 2011). Estas sustancias pueden ser quimioatrayentes o quimiorrepelentes para las células.

Aunque la quimiotaxis bacteriana fue descrita hace más de 120 años por Engelman y Adler centro sus estudios en este fenómeno hace más de cuatro décadas (Adler, 1969, Adler *et al.*, 1973, Adler & Epstein, 1974), no ha sido fácil caracterizar las interacciones moleculares que lo componen. Esto se debe a que el mecanismo de quimiotaxis es bastante complejo e implica a muchas proteínas diferentes encargadas de mediar la transducción de señales desde un estímulo externo, a través de fosforilaciones y defosforilaciones, hasta llegar al motor flagelar. En términos generales podríamos decir que está mediada por dos complejos multiproteicos, siendo el complejo quimiotáctico el encargado de recibir la señal ambiental y trasmitirla hasta un segundo complejo, que es el motor del flagelo, donde ocurre la respuesta al estímulo. Análisis genómicos han mostrado que más de la mitad de las bacterias poseen genes quimiotácticos y estos pueden ser clasificados en 17 tipos diferentes de rutas quimiotácticas, según variaciones en la estructura de los dominios y en la presencia o no de proteínas auxiliares (Wuichet & Zhulin, 2010).

En la actualidad, la quimiotaxis bacteriana es uno de los sistemas de transducción de señales más estudiados, habiéndose identificado bastantes detalles tanto estructurales como bioquímicos del mismo, sobre todo en la bacteria modelo *E. coli* (Wadhams &

Armitage, 2004, Baker *et al.*, 2006). En este organismo modelo ha sido estudiada la diferencia en el movimiento en ausencia y en presencia de un gradiente de sustancia quimioatrayente. El movimiento presentaba carreras de varios segundos interrumpidas por giros momentáneos. Durante las carreras el o los flagelos giran en el sentido contrario a las agujas del reloj (CCW) mientras que durante los momentos de *tumbling* (giros), cambia el sentido de la rotación en sentido de las agujas del reloj (CW). Las células realizan estos giros para poder reorientarse antes de la siguiente carrera. Cuando no existe gradiente químico en el medio este movimiento es aleatorio, mientras que cuando hay una sustancia química en el medio, sea quimioatrayente o quimiorrepelente, las células aumentan sus carreras para llegar a la situación favorable (Sourjik & Wingreen, 2012)(Fig. 1.6).

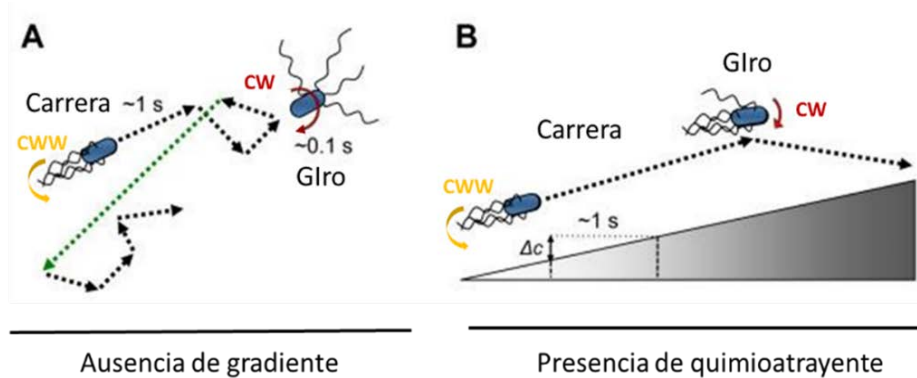


Figura 1.6: Quimiotaxis en *E. coli*. Movilidad de *E. coli* en ausencia (A) y en presencia (B) de un quimioatrayente. Modificado de (Sourjik & Wingreen, 2012)

Por tanto, la célula debe identificar y responder a estos gradientes y al mismo tiempo integrar y amplificar las señales para coordinar la respuesta de movilidad dirigida (Alexandre, 2010). De manera resumida, esta integración y amplificación es llevada a cabo a través de diferentes proteínas: los compuestos químicos son sensados a través de su interacción con proteínas quimiorreceptoras transmembrana, denominadas MCPs (del inglés, *methyl-accepting chemotaxis proteins*) que se localizan en uno o ambos polos bacterianos (Briegleb *et al.*, 2009). Junto a los MCPs se encuentra la proteína adaptadora CheW cuya función es conectar estos quimiorreceptores con la histidin quinasa CheA de un sistema de dos componentes CheA/CheY y la fosfatasa CheZ, formando parte todas ellas del módulo encargado de la transducción de la señal. Estas proteínas actúan en conjunto para

controlar el nivel de fosforilación del regulador de respuesta, CheY, encargado de interaccionar con el flagelo y provocar cambios conformacionales en éste, que darán lugar a un cambio en la rotación del motor (Fig. 1.7).

En este complejo sistema de transducción de señales se ha descrito que las proteínas sensoras o MCPs, encargadas de recibir la señal ambiental, tienen “memoria”, ya que son capaces de reconocer diferentes concentraciones de sustancias o recordar la concentración de una sustancia momentos antes, gracias al estado de metilación de residuos específicos, por lo que pueden no solo integrar, si no también amplificar las señales. A este mecanismo se le ha denominado adaptación quimiotáctica y permite a la célula responder a un amplio rango de concentraciones de sustancias (Alexandre, 2010, Sourjik & Wingreen, 2012). Las proteínas CheR y CheB, metiltransferasas y metilesterasas, respectivamente, son las responsables de regular el grado de metilación de los MCPs, haciendo que estos sean capaces de reconocer diferentes concentraciones de una sustancia y comparar estas concentraciones en el tiempo, dándole sensibilidad al sistema. Estas metilaciones hacen que disminuya la afinidad de los MCPs por el ligando (Sourjik & Berg, 2002). En cuanto a su estructura, los MCPs suelen poseer una región periplásmica de unión a ligando (LBR, del inglés *ligand-binding region*), por la que detectan las señales externas y a través de un cambio conformacional transmiten el mensaje al dominio citoplasmático, que controla la respuesta experimentando estas metilaciones reversibles (Falke & Hazelbauer, 2001), un dominio citosólico y un dominio de señalización. No obstante, se han identificado gran número de MCPs y estos pueden variar en su topología (Matilla & Krell, 2017), como por ejemplo, en algunos de ellos el dominio sensor puede ser periplásmico o citoplasmático, pudiendo incluso no existir la región de unión a ligando en algunos MCPs (Lacal *et al.*, 2010). Este hecho indica que, además de señales ambientales externas, algunos de ellos reciben señales intracelulares al ser citoplasmáticos (Ferrandez *et al.*, 2002). Mediante cristalografía de rayos X de MCPs purificados se ha visto que se organizan en la membrana formando paquetes de dímeros de tres en tres, dando lugar a una estructura hexagonal (Briegleb *et al.*, 2012). En *E. coli* han sido caracterizados los ligandos de muchos MCPs, como por ejemplo el quimiorreceptor Tar para maltosa y aspartato, el Tsr para serina y leucina o el Tap para dipéptidos y pirimidinas. (Falke & Hazelbauer, 2001, Lacal *et al.*, 2010, Parkinson *et al.*, 2015). También ha sido identificado un quimiorreceptor que responde al estado redox de la célula,

mediando aerotaxis, el cual carece de dominio periplásmico (Ferrandez *et al.*, 2002, Bibikov *et al.*, 2004).

Como se acaba de comentar, cuando los MCPs reciben la señal sufren un cambio conformacional que supone la autofosforilación de la quinasa CheA, activándola. Esta autofosforilación es dependiente de ATP y ocurre en residuos específicos de histidina. El dímero CheA fosforilado (CheA-P) trasfiere el grupo fosfato a CheB y a CheY en residuos específicos de aspartato. La proteína CheY en su estado fosforilado (CheY-P) disminuye su afinidad por la proteína CheA y la aumenta por las proteínas FliM y FliN del motor flagelar lo que se traduce en un cambio en la dirección de rotación del flagelo y por tanto en un cambio en la dirección del movimiento (Sampedro *et al.*, 2015). Aunque CheY-P se puede auto-defosforilar, la proteína CheZ aumenta su tasa de defosforilación, haciendo posible que la respuesta que había comenzado ponga fin de manera inmediata, quizás por una disminución en el gradiente de la concentración del quimioatrayente. CheB ejerce su función de metilesterasa cuando es fosforilado por CheA (Anand & Stock, 2002) (Fig. 1.7).

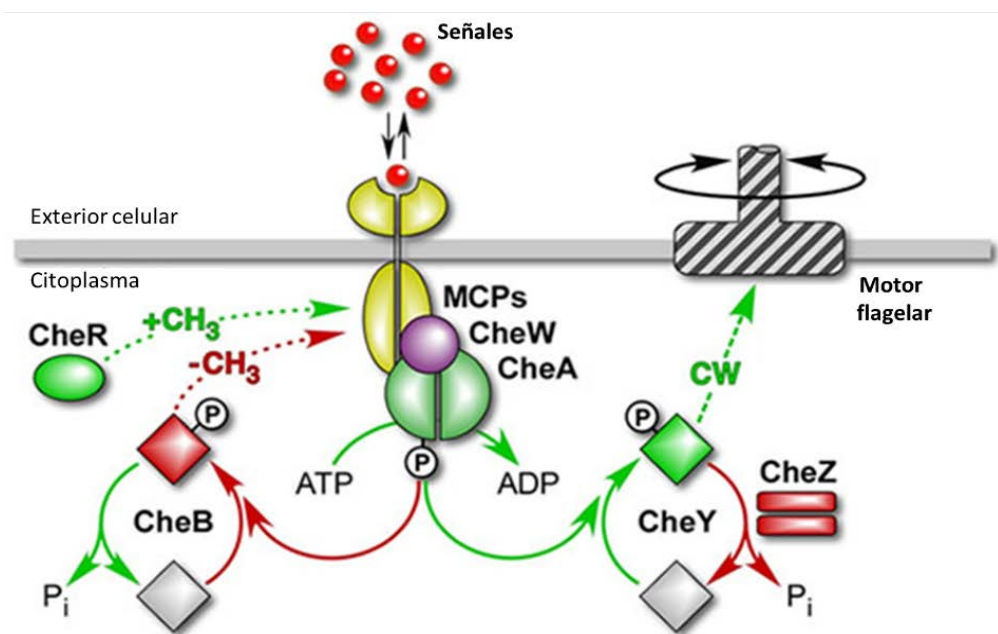


Figura 1.7: Esquema de la transducción de señales quimiotácticas bacterianas. Los componentes proteicos y reacciones que llevan a una rotación del flagelo en dirección CW están coloreadas en verde, mientras que las que llevan a la rotación flagelar en dirección CWW están en rojo. Modificado de Parkinson lab. Sitio web: <http://chemotaxis.biology.utah.edu/Parkinson>

Las formas activas de estos reguladores de respuesta tienen una vida muy corta, ya que rápidamente pierden los grupos fosfato a través de autohidrólisis espontáneas, haciendo que el mecanismo de transducción de señales sea todavía más rápido y sensible, ya que las desfosforilaciones/fosforilaciones son cinéticamente más rápidas que las metilaciones en los MCPs.

Aparte de estas seis proteínas Che presentes en enterobacterias, se han descrito proteínas auxiliares en otras especies bacterianas, como son la proteína CheV, cuya función es adaptadora al igual que CheW (Alexander *et al.*, 2010), la fosfatasa CheC, que defosforila a CheY al igual que CheZ (Fredrick & Helmann, 1994) y CheD, una metilesterasa similar a CheB (Chao *et al.*, 2006), entre otras. La presencia de estas proteínas auxiliares aumenta la sensibilidad y rapidez de respuesta del proceso quimiotáctico.

En enterobacterias el sistema de quimiotaxis es bastante simple, presentando *E.coli* las seis proteínas Che principales con cinco MCPs asociados y una única ruta quimiotáctica (Baker *et al.*, 2006). En cambio, las pseudomonas, debido a su gran versatilidad metabólica, han desarrollado comportamientos quimiotácticos más complejos pudiendo llegar a tener más de 25 proteínas quimiorreceptoras diferentes y múltiples copias de las proteínas Che (Hamer *et al.*, 2010) Por ejemplo, en *P. aeruginosa* PAO1 se han identificado 26 MCPs diferentes asociados en varias rutas quimiotácticas (Ortega *et al.*, 2017).

Las más de 20 copias de las proteínas Che presentes en los genomas de las pseudomonas se agrupan en cinco clústeres diferentes, denominados clústeres I, II, III, IV y V. Solamente los clústeres I, II y V están implicados en la quimiotaxis mediada por flagelos, mientras que el clúster III lo forma el sistema Wsp y el clúster IV presenta los genes *pilGHIJK* y *chpABCDE*, cuya función es la regulación de la expresión de exopolisacáridos Pel y Psl, el movimiento tipo *twitching* y la regulación de los niveles del adenosín monofosfato cíclico (cAMP), respectivamente (Ferrandez *et al.*, 2002, Whitchurch *et al.*, 2004, Hickman *et al.*, 2005, Kato *et al.*, 2008, Fulcher *et al.*, 2010). Mutaciones en los genes *che* de las pseudomonas generan fenotipos inmóviles y/o afectados en la frecuencia de cambio de rotación del flagelo, como ha sido descrito en *P. aeruginosa* y en *P. fluorescens* (Schmidt *et al.*, 2011, Muriel *et al.*, 2015).

Por otro lado, hace ya bastante tiempo que se están identificando las señales específicas de algunos quimiorreceptores, sobre todo en *P. aeruginosa* y *P. putida*. Algunos de estos MCPs responden a compuestos presentes en la rizosfera, como por ejemplo a más de 20 aminoácidos, péptidos, fosfato inorgánico, glucosa, citosina, etileno, fitoalexinas o el recientemente identificado para el ácido α -cetoglutarico (Sly *et al.*, 1993, Kelly-Wintenberg & Montie, 1994, Kuroda *et al.*, 1995, Taguchi *et al.*, 1997, Kato *et al.*, 2008, Liu & Parales, 2009, Neal *et al.*, 2012, Rico-Jimenez *et al.*, 2013, Martin-Mora *et al.*, 2016), permitiendo una correcta colonización de las raíces (Oku *et al.*, 2012, Oku *et al.*, 2014). En el caso de las cepas pertenecientes al grupo de las *P. fluorescens*, los ácidos orgánicos parecen ser los quimioatrayentes preferidos (de Weert *et al.*, 2002). También se han identificado MCPs específicos para compuestos aromáticos presentes en el suelo, como son PCBs, el herbicida atrazina, tolueno, naftaleno o benzonato (Harwood, 1989, Grimm & Harwood, 1999, Parales *et al.*, 2000, Gordillo *et al.*, 2007, Liu & Parales, 2009). No cabe duda que la amplia gama de quimiorreceptores específicos de compuestos hace a las pseudomonas capaces de metabolizar y degradar diferentes sustancias y por tanto crecer en diferentes ambientes. Sin embargo, el comportamiento quimiotáctico de las pseudomonas no es uniforme, pudiendo algunas cepas sentirse atraídas por compuestos que otras repelen, como es el caso del cloroetileno, quimioatrayente para *P. putida* pero no para *P. aeruginosa*, quien lo evita (Shitashiro *et al.*, 2005). Además, se han identificado MCPs cuyo dominio LBR presenta dos sitios de reconocimiento para ligandos diferentes (Pineda-Molina *et al.*, 2012).

En *P. aeruginosa* se han descrito dos sistemas quimiotácticos mediados por flagelo, denominados Che y Che2 (Kato *et al.*, 1999), aparte de los clústeres III y IV ligados a otros fenotipos relacionados con la formación de biopelículas (Caiazza *et al.*, 2007). En cambio, se han identificado cepas bacterianas que poseen tres sistemas quimiotácticos, como es el caso de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. En ella han sido muy estudiados los mecanismos de transducción de señales quimiotácticos, demostrándose que las histidín quinasa CheA de cada uno de sus tres sistemas interaccionan con cada una de las cinco proteínas CheY codificadas en el mismo o difentes operones (Porter *et al.*, 2008).

En *P. fluorescens* F113 han sido identificados cinco sistemas quimiotácticos diferentes, denominados Wsp, Chp, Che1, Che2 y Che3. Los sistemas Wsp y Chp están presentes en todas las cepas de pseudomonas secuenciadas hasta la fecha. El sistema Wsp

está implicado en la regulación inversa de la movilidad y en la formación de biopelículas, mediante la producción del mensajero intracelular c-di-GMP, (Navazo *et al.*, 2009, Barahona *et al.*, 2010). Mientras que el sistema Chp, localizado adyacente a los genes *pil* se relaciona con la formación del pili tipo IV. Los otros tres sistemas están implicados en la movilidad dependiente de flagelo tipo *swimming*. El sistema Che1 es común a todos los sistemas de quimiotaxis secuenciados, localizándose sus genes adyacentes a genes implicados en la síntesis de flagelo y dividido en dos regiones del cromosoma. En cambio, los sistemas Che2 y Che3 se localizan formando regiones compactas y presentan una organización génica similar. Ambos sistemas contienen genes que codifican MCPs, concretamente dos cada uno de ellos, de los más de 30 genes codificantes para proteínas quimiosensoras que posee esta cepa repartidas por el cromosoma (Redondo-Nieto *et al.*, 2013) (ver material suplementario del capítulo 4). Como se detalla en el capítulo 4, los tres sistemas quimiotácticos de *P. fluorescens* F113 son funcionales, ya que mutaciones en los genes *cheA* de cada uno de ellos muestran afectada la capacidad de movimiento tipo *swimming* y la colonización de la rizosfera (Muriel *et al.*, 2015). Además, como ha sido descrito para el sistema Che2 de *P. aeruginosa* y para los operones CheOp2 y CheOp3 de *R. spaeroides* (Ferrandez *et al.*, 2002), el sistema Che3 parece ser fundamental en condiciones de anaerobiosis, aumentando la capacidad de colonización de la rizosfera bajo estas condiciones (Muriel *et al.*, 2015). Sin embargo, el sistema Che3 de *P. fluorescens* F113 no comparte homología con ninguno de los sistemas de *P. aeruginosa* o *R. sphaeroides*. Solamente posee homología de secuencia con cepas de pseudomonas muy relacionadas, como son *P. fluorescens* FR1 y diferentes cepas de *P. brassicacearum*.

Por último, para identificar los compuestos quimioatrayentes o quimiorrepelentes a los que responden las bacterias se siguen diferentes aproximaciones. Por un lado, se pueden realizar ensayos cualitativos, en los que se puede observar a gran escala si un compuesto químico actúa como atrayente o repelente para una determinada cepa bacteriana. Estos ensayos son fáciles y rápidos de realizar, como es la técnica en placa de agar, donde a través de la movilidad tipo *swimming* de la bacteria se puede analizar si nada a favor o en contra del compuesto químico a ensayar, colocado en un punto de la placa lejano al punto de inoculación de la bacteria. Por otro lado, existen los ensayos en capilares que muestran de forma cuantitativa el movimiento quimiotáctico. Con ellos, además de analizar si la sustancia es quimioatrayente o quimiorrepelente se puede también cuantificar el grado de

atracción o repulsión que presenta en la cepa bacteriana ensayada (Darias *et al.*, 2014). Existen también técnicas alternativas que utilizan ensayos con microfluído (Jeong *et al.*, 2010), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, del inglés, *fluorescence resonance energy transfer*) (Sourjik *et al.*, 2007), o las más recientemente publicadas, fluorimetría diferencial de barrido (DMF) (del inglés *Differential Scanning Fluorimetry*) o calorimetría de valoración isotérmica (ITC) (del inglés *Isothermal titration calorimetry*). Los análisis DMF permiten identificar la posible unión de ligandos a los MCPs por incrementos de la temperatura, pero no proporcionan pruebas consistentes, por lo que este tipo de análisis deben ser complementados con ITC (Krell, 2015, Matilla & Krell, 2017, Fernandez *et al.*, 2018).

La quimiotaxis tiene gran influencia en procesos de movilidad, adhesión y formación de biopelículas, por lo que es de vital importancia para que ocurra una correcta y competente colonización de la rizosfera por parte de las PGPRs o de bacterias patógenas. Ha sido descrito que mutantes de *Ralstonia solacearum* en los genes *cheA* o *cheW* no son capaces competir con la estirpe silvestre en ensayos de colonización competitiva (Yao & Allen, 2006). También se ha demostrado que este proceso es fundamental para la formación de nódulos por *Rhizobium leguminosarum* (Miller *et al.*, 2007). Además, la gran versatilidad en rutas y proteínas quimiorreceptoras presentes en las bacterias les permite tener una detección muy sensible de las condiciones ambientales y responder de manera eficaz a sus cambios.

4.2 La variación de fase

Como se ha descrito con anterioridad la capacidad de movimiento es un factor de gran importancia para la competencia bacteriana. Se ha descrito que en *P. fluorescens* F113 durante el proceso de colonización de la rizosfera se seleccionan variantes de fase hipermóviles más competitivos que la estirpe silvestre. Hay que destacar que el fenómeno de variación de fase ha sido descrito en muchas especies bacterianas y produce cambios fenotípicos reversibles de alta frecuencia que están mediados por mutaciones, reorganizaciones o modificaciones del DNA (Saunders *et al.*, 2003). Esto genera diversidad fenotípica y genotípica en la población, estrategia fundamental para una correcta

adaptación al ambiente donde habitan (Dybvig, 1993). El proceso de variación de fase afecta principalmente a componentes superficiales de la bacteria, como son, por ejemplo, flagelos o antígenos de membrana. Estos componentes intervienen en la movilidad y adhesión a superficies, teniendo gran importancia en la colonización de la rizosfera (Lugtenberg *et al.*, 2001).

Los mecanismos moleculares causantes de este proceso son diversos, como por ejemplo errores durante la replicación del DNA que generan cambios en el marco de lectura durante la transcripción y la traducción, reordenamientos genómicos, cambios en el perfil de metilación de determinados genes, reparaciones defectuosas del DNA o eventos de recombinación entre genes diferentes (Henderson *et al.*, 1999, Park *et al.*, 2000, Borst, 2003, van der Woude & Baumber, 2004, Criss *et al.*, 2005). En la mayoría de los casos, estos mecanismos moleculares producen cambios en la expresión génica.

Uno de los mecanismos más estudiados es el mediado por las recombinasas específicas de sitio, que provocan inversiones o deleciones en regiones específicas del genoma por recombinación de secuencias homólogas (Abraham *et al.*, 1985). XerC en *E. coli* y Sss en *Pseudomonas*, son recombinasas específicas de sitio implicadas en la segregación del cromosoma y en la variación de fase. Estas enzimas promueven la recombinación conservativa recíproca entre dos pequeñas secuencias homólogas de DNA que no requiere síntesis de DNA. La presencia y orientación de dos de estas secuencias llevará a la inversión o escisión del fragmento de DNA situado entre ambos sitios de reconocimiento (Sadowski, 1986). Mutantes en el gen que codifica la recombinasa específica de sitio *sss* en la cepa *P. fluorescens* WCS365, presentaban una reducida capacidad de colonizar el ápice radicular en raíces de tomate, siendo el fenómeno de variación de fase uno de los factores más importantes en una colonización competente de la rizosfera (Dekkers *et al.*, 1998, van den Broek *et al.*, 2005a).

Otro tipo de mecanismo responsable del fenómeno de variación de fase, siendo el más abundante en las *Pseudomonas*, es la generación de mutaciones espontáneas en el sistema de dos componentes GacA/GacS (van den Broek *et al.*, 2005b). Entre otras funciones, este sistema regula la síntesis de metabolitos secundarios y la producción de exoenzimas en las *Pseudomonas* (van den Broek *et al.*, 2003). Este tipo de variantes

fenotípicos se han encontrado principalmente en la rizosfera de plantas colonizadas por especies de *Pseudomonas* con capacidad de biocontrol sobre determinados fitopatógenos. Estos variantes fenotípicos tienen reprimida la producción de compuestos del metabolismo secundario como el DAPG o el HCN, estando también limitados en la comunicación por QS y formación de biopelículas. Con este mecanismo se formaría una comunidad mixta en la que los mutantes *gac* tendrían ventaja en la colonización, pero no producirían compuestos del metabolismo secundario, por lo que sería la población sin variación de fase la que permanecería con la actividad de biocontrol (Rich *et al.*, 1994, Duffy & Defago, 2000, Bull *et al.*, 2001, Chancey *et al.*, 2002, Sanchez-Contreras *et al.*, 2002, Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 2003, van den Broek *et al.*, 2003).

En *P. fluorescens* F113 se han identificado variantes de fase aislados de la rizosfera capaces de colonizar las zonas más alejadas de la raíz, que resultaron tener mayor expresión de flagelina y por tanto mayor movilidad (Sanchez-Contreras *et al.*, 2002). También ha sido demostrado que tres de estos mutantes naturales desplazan a la estirpe silvestre en ensayos de colonización competitiva de la rizosfera (Martinez-Granero *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que la variación de fase que presenta esta bacteria podría ser una estrategia de competencia durante el proceso de colonización de la rizosfera para poder llegar a las zonas menos accesibles. De hecho, la observación de que los variantes de fase seleccionados durante el proceso de colonización de la raíz de la planta son más competitivos que la estirpe silvestre ha concluido en que es más importante esta capacidad de variar y moverse más que la estirpe silvestre, que la formación de biopelículas para la competencia de esta bacteria en el nicho rizosférico (Martinez-Granero *et al.*, 2006, Barahona *et al.*, 2010). Además, al inocular la raíz de la planta con un mutante *sss* se observó menor tasa de generación de variantes de fase naturales, por lo que esta recombinasa es fundamental en la formación de variantes de fase en *P. fluorescens* F113. Esta cepa tiene otra recombinasa específica de sitio, denominada XerD. Cuando se sobreexpresaron tanto *sss* como *xerD* en experimentos de colonización de la rizosfera se aislaron mayor número de variantes de fase que los aislados de forma natural. Además, todos los variantes de fase naturales de *P. fluorescens* F113 presentaban alteraciones en el sistema de dos componentes GacA/GacS, represor de la producción del primer flagelo (Martinez-Granero *et al.*, 2005, Martinez-Granero *et al.*, 2006, Martinez-Granero *et al.*, 2012), así como en la producción del segundo aparato flagelar (Barahona *et al.*, 2016).

4.3 Adhesión al sustrato y formación de biopelículas

Aunque la capacidad de moverse otorga a los microorganismos múltiples ventajas, es el establecimiento en comunidad lo que predomina en el medio natural, ya sea formando tapetes, flóculos, sedimentos o biopelículas sobre numerosas superficies en todos los ambientes (Costerton, 1999). Esto es debido a que la estrategia de forma de vida sésil en comunidades, intra o interespecíficas, ofrece a las bacterias una ventaja adaptativa en lo que se refiere a la colonización y permanencia en el ambiente, ya que les confiere mayor resistencia a gran variedad de factores ambientales como son la desecación, radiación ultravioleta y moléculas con actividad microbiana y son metabólicamente más eficientes que desarrollándose de forma individual (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Como ya se ha comentado, para la correcta función de las PGPRs es necesario que la interacción mutualista entre planta y bacteria perdure en el tiempo, pero ha sido en bacterias patógenas donde mejor se ha estudiado el proceso de formación de biopelículas, ya que resulta verdaderamente difícil erradicar a estas comunidades organizadas en biopelículas que se desarrollan en instrumental hospitalario, en lugares de procesamiento de la industria alimentaria, en plantas purificadoras de agua o incluso en el tejido pulmonar como es el caso de *P. aeruginosa* en enfermos de fibrosis quística.

La formación de biopelículas se define como agregados de microorganismos sésiles, adheridos a un sustrato o a una interfase, que están embebidos por una matriz extracelular de origen bacteriano compuesta principalmente por polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas (Hurlow *et al.*, 2015). Es la presencia de esta matriz extracelular lo que confiere a estas estructuras la capacidad de funcionar de forma organizada, siendo el medio por el que interactúan todos los miembros de la biopelícula. La composición de esta matriz es variable dependiendo del tipo de microorganismos que estructuren la biopelícula y de las condiciones ambientales a las que estén respondiendo, pero sí que es esencial para el desarrollo de las biopelículas y es la responsable de dar la resistencia frente a estrés ambiental (Tallawi *et al.*, 2017).

Las etapas consecutivas que constituyen la formación de biopelículas son: (i) una inicial adhesión reversible (ii) adhesión irreversible o formación de microcolonias (iii) formación de biopelícula maduras y (iv) dispersión de algunas o todas las células que formaban la biopelícula (Sauer *et al.*, 2002) (Fig. 1.8).

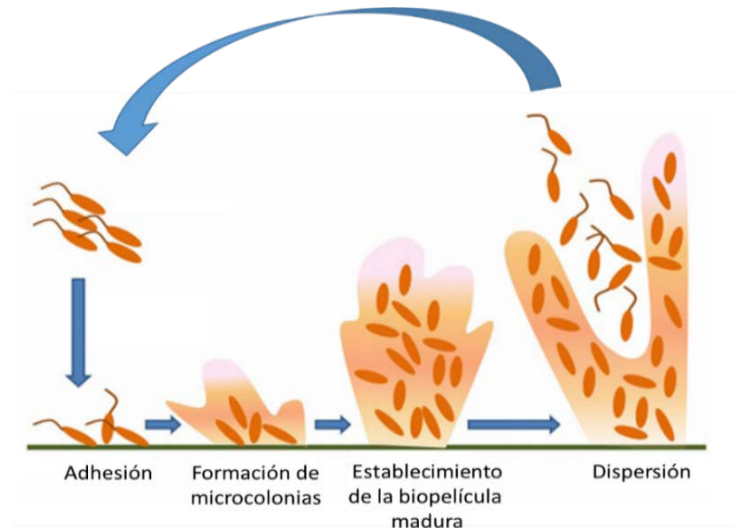


Figura 1.8: Etapas en la formación de una biopelícula. Las células móviles gracias al proceso quimiotáctico eligen una superficie que colonizar. Primero se adhieren a ella de forma reversible para la posterior unión irreversible con la formación de microcolonias. Posteriormente se establece una biopelícula madura y finalmente ocurre la dispersión de los microorganismos que la componen en busca de una nueva superficie que colonizar. Modificado de (Gupta *et al.*, 2016).

En términos generales, el mecanismo de adhesión de la bacteria a superficies consta de dos fases: adsorción y anclaje. La fase de adsorción ocurre gracias a la movilidad quimiotáctica dependiente de flagelos, mediante la cual las bacterias son capaces de detectar condiciones favorables para la colonización de una superficie. Esta fase consiste en una unión rápida y débil de la bacteria a la superficie donde vaya a establecerse e involucra a flagelos y pili (Pratt & Kolter, 1998, Petrova & Sauer, 2012). En la fase de anclaje, algunas de las células que han establecido unión a la superficie empiezan a producir los exopolisacáridos que formarán la matriz extracelular, pasando a tener una unión irreversible y comenzando así el desarrollo de la siguiente etapa, la formación de microcolonias, que acabarán o no, transformándose en macrocolonias generando la biopelícula madura (Klausen *et al.*, 2003). Algunas células de la biopelícula pueden comenzar la dispersión, etapa que ocurre usualmente cuando las condiciones ambientales cambian (Sauer *et al.*, 2002, Lasa, 2006).

Los mecanismos moleculares asociados a esta diferenciación de estilo de vida son numerosos y diversos y dependen, además de cambios en la expresión génica de los microorganismos que la desarrollen, de cambios ambientales (Klausen *et al.*, 2006). En los estadios iniciales se ha descrito la participación de los flagelos y los pili, concretamente los pili de tipo I y de tipo IV. Varios trabajos demostraron que mutantes en la producción de estos pili son defectuosos en el proceso de adhesión al sustrato y en la formación de microcolonias (Vesper, 1987, Pratt & Kolter, 1998). Los flagelos por su parte, además de permitir a las células el movimiento hacia la superficie a colonizar, parecen jugar un papel importante en las primeras etapas de reconocimiento de la superficie. En diferentes trabajos se ha demostrado que mutantes en *fliC* o *fliA*, con fenotipo inmóvil, son incapaces de adherirse a superficies (Barahona *et al.*, 2010, Rodríguez-Herva *et al.*, 2010). Además, las bacterias gram negativas poseen, aparte del peptidoglicano, una capa adicional en su pared compuesta de lipopolisacárido. Este lipopolisacárido está constituido por el lípido A, un núcleo o core y el antígeno-O, sugiriéndose que el antígeno-O podría estar implicado en la adhesión al sustrato (Lerouge & Vanderleyden, 2002). También se han identificado en diferentes cepas de *Pseudomonas* genes implicados en estas etapas iniciales a los que se les denominó genes *sad* (del inglés *surface attachment defective*) (O'Toole & Kolter, 1998a, O'Toole & Kolter, 1998b). Gracias a la identificación de estos genes por primera vez se relacionó de forma inversa el proceso de formación de biopelículas y la movilidad dependiente de flagelos (Caiazza *et al.*, 2007). Otros elementos fundamentales para una correcta formación de las biopelículas son las adhesinas, proteínas de gran tamaño de la superficie celular que van a unirse a sustancias presentes en la zona a colonizar. Ha sido demostrado en varios estudios que mutantes en los genes que codifican diferentes tipos de estas adhesinas (genes *lap*) son defectuosos en la colonización de semillas y de la raíz (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000, Yousef-Coronado *et al.*, 2008, Martínez-Gil *et al.*, 2010). Además, al ser el desarrollo de las biopelículas dependiente de los factores ambientales, son varios los sistemas de dos componentes presentes en las células procariotas, los encargados de responder al ambiente y comenzar la transducción de señales durante este proceso. Se han descrito algunos de estos sistemas, como son los sistemas de dos componentes Ret, Lad y Gac y el sistema formado por BfiSR, BfmSR y MifSR que controlan mediante diferentes mecanismos distintas etapas en la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* (Rasamiravaka *et al.*, 2015). También ha sido descrita la influencia de factores σ , como es el

caso de RpoS, que activa la transcripción del operón que codifica el exopolisacárido Psl (Irie *et al.*, 2010). Por otra parte, han sido caracterizados muchos mutantes defectuosos en la formación de biopelículas que tienen relación con el segundo mensajero c-di-GMP, como se detallará en el siguiente apartado, así como los relacionados con el mecanismo de QS. Gracias al QS las bacterias son capaces de comunicarse entre sí a través de moléculas difusibles (Fuqua *et al.*, 1994). Esta comunicación es fundamental en la formación de biopelículas, ya que las células están organizadas en comunidad y utilizan este mecanismo para poder modular la adhesión a superficies, la movilidad, la producción de EPS y la dispersión (Nadell *et al.*, 2009).

Como ya se ha comentado, en *P. fluorescens* F113 ha sido observada la formación de microcolonias sobre la superficie radicular, siendo no esencial en esta cepa la formación de biopelículas maduras para llevarse a cabo una eficiente colonización de la rizosfera (ver figura 1.2) (Barahona *et al.*, 2010).

4.4 El c-di-GMP

Son muchos los estudios que se están desarrollando en la actualidad sobre este segundo mensajero celular. En el proceso de regulación de la movilidad bacteriana, aparte de tener una importante función la síntesis coordinada del aparato flagelar como se detallaba en el apartado 4.1.1, existe otra regulación llevada a cabo por el c-di-GMP que ocurre independientemente del ensamblaje del flagelo y determinará el estilo de vida, móvil o sésil, de la célula (Jenal *et al.*, 2017).

El (3'→5') diguanosin monofosfato cíclico (c-di-GMP) fue descrito por primera vez en el año 1987 por el grupo de Moshe Benziman como un activador alostérico de la enzima celulosa sintasa en la bacteria *Gluconacetobacter xylinus*, ahora llamada *Acinetobacter xylinus* (Ross *et al.*, 1987). Desde entonces, ha emergido como un segundo mensajero central y ubicuo en procariotas, implicado en orquestar los estilos de vida bacteriano a través de la regulación de la transición entre el estado planctónico móvil al estado sésil o de formación de biopelículas y desde el estado virulento en infecciones agudas a un estado

menos virulento característico de enfermedades crónicas (Krasteva *et al.*, 2012, Römling *et al.*, 2013).

Años después de su descubrimiento, fue el mismo grupo liderado por Benziman el que identificó los genes que codifican las proteínas responsables de su síntesis y degradación, diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs), respectivamente (Tal *et al.*, 1998). Gracias al gran número de genomas secuenciados hoy sabemos que las bacterias poseen numerosos genes que codifican proteínas con estos dominios y, además, suelen presentar en la misma proteína dominios sensores, permitiendo así que las señales ambientales o intracelulares que regula los niveles del c-di-GMP queden integradas en el mecanismo de transducción de señal. Desde un punto de vista práctico queda establecido que la modulación de las vías de señalización de c-di-GMP representan la regulación de los estilos de vida bacterianos en respuesta a cambios ambientales (Ryan *et al.*, 2006, Schirmer & Jenal, 2009, Römling *et al.*, 2013).

4.4.1 Metabolismo y regulación del c-di-GMP

El c-di-GMP es sintetizado a partir de dos moléculas de guanosin trifosfato (GTP) por DGCs que presenten un dominio GGDEF conservado (Fig. 1.9). Fue con la cristalización de la DGC PleD de *Caulobacter crescentus* cuando se identificaron las conformaciones activas e inactivas de estos enzimas y su mecanismo de acción (Chan *et al.*, 2004, Wassmann *et al.*, 2007). Los dominios GGDEF funcionan como homodímeros donde el sitio activo, localizado en la interfase del dímero, está implicado en la unión de GTP y en la catálisis. Los dos primeros residuos (G) del motivo GGDEF están implicados en la unión del GTP, el tercero (D/E) es fundamental para la catálisis y el cuarto (E) está implicado en la coordinación con iones metálicos Mg_2^+/Mn_2^+ necesarios para la formación del enlace fosfoéster. El mecanismo principal para la activación de las DGCs es el cambio conformacional que debe producirse para que interaccionen sus monómeros y este ocurre en respuesta a cambios en los dominios sensores (PAS) o receptores de señal (REC) activados por señales ambientales (Wassmann *et al.*, 2007).

La degradación del c-di-GMP está catalizada por proteínas con actividad fosfodiesterasa (PDE) a través de dominios EAL o HD-GYP. Al degradarse se originan el dinucleótido linear 5'-fosfoguanilil-(3'→5')-guanosina (5'-pGpG), en el caso del motivo EAL o 2 moléculas de GMP, en el caso del motivo HD-GYP (Fig. 1.9). En el caso de las PDEs con motivo EAL, puede continuar la degradación del 5'-pGpG para originar GMP, pero es una reacción muy lenta, lo que sugiere que *in vivo* esta hidrólisis podría llevarse a cabo por otras enzimas alternativas (Caly *et al.*, 2015). Mucho menos se ha descrito sobre el dominio HD-GYP, aunque sí se sabe que la hidrólisis de c-di-GMP a dos moléculas de GMP es mucho más rápida que la llevada a cabo por el dominio EAL (Winkler *et al.*, 2014). A diferencia de las DGCs, algunas PDEs mantienen parte de su actividad como monómeros, sin embargo, la gran mayoría necesita oligomerizar, y la dimerización parece clave en la activación de PDEs por estímulos ambientales (Sundriyal *et al.*, 2014, Winkler *et al.*, 2014).

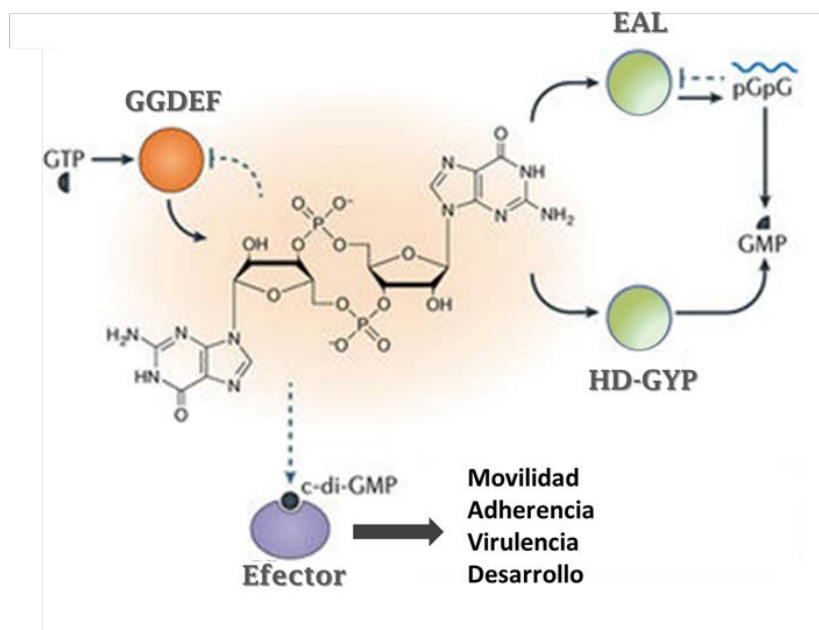


Figura 1.9: Metabolismo y regulación del c-di-GMP. Modificado de (Jenal *et al.*, 2017).

Análisis genómicos han revelado que en un mismo polipéptido pueden aparecer ambos dominios, formando parte de proteínas multidominio. En algunos casos es posible que la proteína actúe como un enzima bifuncional, con una actividad dominando sobre la otra dependiendo de las señales ambientales o intracelulares que reciba. Pero normalmente, uno de los dominios es inactivo o ha adquirido una nueva función de regulador alostérico o bien, simplemente realiza un papel estructural. Como ejemplo, la proteína CC3396 de *C.*

crescentus presenta un motivo GGDEF degenerado cuya función es unir GTP de manera que ejerce una función alostérica al aumentar la afinidad por el sustrato (Christen *et al.*, 2006).

Como ya se ha comentado, es habitual encontrar proteínas que además de tener dominios de DGCs o PDEs presenten dominios sensores que podrían regular su actividad. Los dominios REC, GAF o PAS son los más comúnmente encontrados. Las proteínas con dominios REC suelen ser reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes. Los dominios GAF y PAS suelen unirse a pequeños ligandos como cromóforos, hierro o flavonoides. Normalmente se encargan de detectar oxígeno, nitrógeno, carbono, luz, señales de QS o moléculas de la cadena de electrones. Se sabe que las proteínas con estos dominios pueden ser tanto citosólicas como de membrana, lo que sugiere que múltiples señales celulares y ambientales pueden ser integradas en la vía de señalización del c-di-GMP (Römling *et al.*, 2013).

Aparte de los dominios encargados de su síntesis y degradación, para ejercer su función, el segundo mensajero c-di-GMP debe unirse a proteínas efectoras o moléculas de RNA (Boyd & O'Toole, 2012). Al contrario de la identificación de los dominios GGDEF y EAL, la identificación de receptores de c-di-GMP continúa siendo una labor difícil, siendo incompleta la información de la que se dispone. Varias clases de proteínas efectoras de c-di-GMP han sido caracterizadas estructuralmente, pero solamente se ha podido identificar el sitio de unión en algunas de ellas (Chou & Galperin, 2016). A continuación, se exponen algunos de los motivos que reconocen e interaccionan con este segundo mensajero descritos hasta la fecha, incluyendo proteínas con dominio PilZ, proteínas con dominios GGDEF y EAL degenerados, factores de transcripción y moléculas de RNAm (*riboswitches*).

El primer tipo de motivo efector identificado fue el dominio PilZ, que posee alta afinidad por el c-di-GMP y es capaz de unir incluso dímeros de este segundo mensajero (Whitney *et al.*, 2015). Este dominio está presente en muchos genomas bacterianos y ha sido descrita su funcionalidad en proteínas de diversas especies tales como BcsA o YcgR de *E. coli* (Ryjenkov *et al.*, 2006), DgrA de *C. crescentus* (Christen *et al.*, 2007), PlzC y PlzD de *Vibrio cholerae* (Pratt *et al.*, 2007) o FlgZ de *P. fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2014a) y de *P. aeruginosa* (Baker *et al.*, 2016). La unión al c-di-GMP por el dominio PilZ puede ocurrir de diferentes formas y se han establecido dos motivos consenso: RXXXR y

(D/N)X(S/A)XXG (Amikam & Galperin, 2006, Benach *et al.*, 2007). Se ha descrito que actúa a diferentes niveles, tanto en la regulación de la movilidad impidiendo la función flagelar interactuando directamente con proteínas del motor flagelar, como en la producción de celulosa y formación del pili (Amikam & Galperin, 2006, Ryjenkov *et al.*, 2006, Martinez-Granero *et al.*, 2014a). Además, podemos encontrar el dominio PilZ junto a dominios GGDEF, EAL o HD-GYP, formando parte de la misma proteína, lo que es consistente con que todos ellos intervienen en la regulación del c-di-GMP (Chou & Galperin, 2016). Durante un tiempo se creyó que el dominio PilZ era el único capaz de unir c-di-GMP, pero rápidamente se demostró que no era suficiente ya que se había observado la presencia de dominios GGDEF y EAL en genomas que en cambio no presentaban este dominio sensor. Por tanto, parecía claro que no era el único motivo capaz de unir c-di-GMP (Amikam & Galperin, 2006, Lai *et al.*, 2009).

Otro receptor descrito para este segundo mensajero es el sitio de autoinhibición o *I-site* de algunas DGCs. Su función es controlar la activación de las DGCs mediante inhibición por retroalimentación, al limitar el tiempo de activación y evitando así la acumulación de altos niveles de c-di-GMP. Está formado por cuatro residuos aminoácidos generando el motivo RXXD, donde X es cualquier residuo, y suele encontrarse cinco aminoácidos aguas arriba de motivo GGDEF. Está presente en un 50% de los dominios DGCs (Römling *et al.*, 2013), como ocurre en las proteínas WspR y GcbC de *Pseudomonas* (De *et al.*, 2009, Dahlstrom *et al.*, 2016). Ha sido descrito recientemente un posible mecanismo de retroalimentación por sustrato, en el que el GTP es el encargado de la activación alostérica de las DGCs (Oliveira *et al.*, 2015). También ha sido identificado un nuevo mecanismo de respuesta a c-di-GMP en el que, en este caso para la PDE PdeR de *E. coli*, que no solo se encarga de unir a este segundo mensajero, sino que también lo degrada, bajando sus niveles intracelulares mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Lindenberg *et al.*, 2013). Cabe señalar que muchas de las proteínas que poseen dominios GGDEF y EAL degenerados unen c-di-GMP para inhibir alostericamente su actividad, actuando por tanto como receptores de este segundo mensajero. Se han descrito numerosas proteínas con esta capacidad, como son FimX, PelD y LapD de *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2007, Navarro *et al.*, 2009, Dahlstrom *et al.*, 2015), o FilP en *Xanthomonas oryzae* (Yang *et al.*, 2014). Cada una de ellas involucradas en diferentes funciones como son la regulación de la movilidad, la producción de exopolisacáridos o la activación de genes de virulencia.

Ha sido descrito en algunas proteobacterias la existencia de un regulador de respuesta del c-di-GMP con un inusual dominio HD, HDOD (*HD-related output domain*) que puede aparecer como único dominio proteico o junto a otros dominios reguladores, como REC o GGDEF (Galperin, 2006). El análisis de su estructura y secuencia revelan que este dominio está distante del conocido HD-fosfohidrolasa, ya que el motivo de unión a metales típico del dominio HD no está conservado (Aravind & Koonin, 1998). La función de este dominio en la transducción de señales sigue siendo desconocida a día de hoy, aunque ha sido descrito en diferentes proteínas bacterianas. Por ejemplo, en el factor de virulencia CJ0248 de *Campylobacter jejuni*, que solamente posee este dominio y parece estar involucrado en la colonización del tracto intestinal de aves (Hendrixson & DiRita, 2004) o el regulador de respuesta GsmR de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en el que aparece acompañado de un motivo REC y cuya función está relacionada con la biosíntesis del aparato flagelar (Liu *et al.*, 2013). Recientemente se han descrito otras dos proteínas en *X. campestris* pv. *campestris* con este inusual dominio, HdpA y HdpB (Lee *et al.*, 2016). HdpA posee un dominio GGDEF además del dominio HDOD mientras que HdpB solamente presenta el dominio HDOD. Ambas proteínas parecen estar involucradas en movilidad, adherencia y producción de exopolisacáridos. Además, la proteína SadB de *P. aeruginosa* también posee un dominio HDOD junto a un dominio de la familia Ybak de función desconocida y ha sido sugerida su función como sensor de c-di-GMP (Merritt *et al.*, 2007). Con estos datos podemos pensar que el dominio HDOD podría ser un nuevo dominio de unión al c-di-GMP cuya función no está aclarada hasta el momento.

También han sido incluidos como receptores de c-di-GMP algunos reguladores de la transcripción, como por ejemplo FleQ (Baraquet & Harwood, 2013, Molina-Henares *et al.*, 2017). Este regulador transcripcional pertenece a la familia NtrC/DctD y controla la expresión de los genes de biosíntesis de exopolisacáridos y adhesinas, genes relacionados con la virulencia, así como la formación del aparato flagelar (Baraquet *et al.*, 2012, Martinez-Granero *et al.*, 2012, Matsuyama *et al.*, 2016). Otros reguladores transcripcionales descritos como receptores de c-di-GMP son BrlR en *P. aeruginosa* (Chambers *et al.*, 2014), Cpl en *Xanthomonas* (Leduc & Roberts, 2009) y Bcam1349 en *Burkholderia* (Chin *et al.*, 2010). Otras proteínas que tienen actividad ATPasa similar a FleQ, como por ejemplo Flil de *P. fluorescens* SBW25 también han sido descritas como receptores de c-di-GMP (Trampari *et al.*, 2015).

Aparte de los motivos proteicos descritos como sensores de c-di-GMP, se han identificado algunos tipos de RNA estructurales que tienen capacidad de unión a este segundo mensajero controlando la expresión de mRNAs codificantes para proteínas DGCs y PDEs (Sudarsan *et al.*, 2008, Luo *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2016).

Una de las razones por las que existe tanta variedad de proteínas de unión al c-di-GMP es su diversidad estructural, ya que es una molécula muy flexible que puede adoptar en solución varias conformaciones diferentes. Los análisis de alta resolución han mostrado que esta molécula puede encontrarse en solución formando monómeros o condensarse en forma de dímeros (Chou & Galperin, 2016, Dubey *et al.*, 2016). Además, cuando se encuentra unido a proteínas sensoras puede oligomerizar formando complejos proteicos como dímeros y tetrámeros, como es el caso de la proteína BldD de *Streptomyces coelicolor*, en el que cuatro moléculas de c-di-GMP forman un puente de unión entre dos BldD, activándola como dímero (Tschowri *et al.*, 2014). Al ser tan numerosos los dominios proteicos implicados en la regulación de este segundo mensajero se puede afirmar que sus niveles intracelulares están finamente controlados. No cabe duda de que en los próximos años se identificarán nuevos receptores y dianas implicados en esta compleja red de regulación.

4.4.2 Fenotipos regulados por el c-di-GMP.

Como se acaba de explicar, es enorme la diversidad de proteínas implicadas en la regulación de los niveles intracelulares del c-di-GMP, lo que implica que los procesos celulares controlados por este segundo mensajero sean muy diferentes y todos de gran importancia para la supervivencia celular.

Hasta la fecha se sabe que el c-di-GMP está implicado en la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos, en la regulación de los estilos de vida bacteriano (movilidad *versus* formación de biopelículas), en la respuesta a estrés y supervivencia, en la síntesis de metabolitos secundarios, en el control de la proteólisis y progresión del ciclo celular, en la virulencia bacteriana y en la respuesta a cambios ambientales como son por ejemplo la concentración de oxígeno y de óxido nítrico (Jenal *et al.*, 2017). En términos generales, altos niveles intracelulares de c-di-GMP promueven la formación de exopolisacáridos, adhesinas,

establecimiento de un estilo de vida sésil y diferenciación celular. Más específicamente se ha identificado su implicación en la formación de heterocistos en cianobacterias y en la supervivencia y transmisión de algunos patógenos intracelulares (Kuchma *et al.*, 2007, Bobrov *et al.*, 2008, Steiner *et al.*, 2013), así como en conferir morfología rugosa a las colonias (Güvener & Harwood, 2007). Por otro lado, bajos niveles intracelulares de este segundo mensajero promueven la vida móvil mediante diferentes procesos; *swimming*, *swarming*, *twitching* o *gliding* (Kim & McCarter, 2007) y la producción de factores de virulencia, como toxinas o la expresión de sistemas de secreción (Ryan, 2013).

Podemos clasificar las principales funciones celulares de c-di-GMP en tres importantes aspectos de la fisiología bacteriana: (i) desarrollo y morfogénesis, (ii) transición de vida móvil a vida sésil y (iii) virulencia.

Con respecto a su implicación en desarrollo y morfogénesis celular, se ha observado en muchas bacterias que los niveles de c-di-GMP intracelulares presentan una distribución asimétrica durante la división celular, afirmando que este segundo mensajero controla el comportamiento celular durante la reproducción (Christen *et al.*, 2010). Por ejemplo, ha sido descrito en *P. aeruginosa* que durante un breve periodo tras la división celular la célula hija presenta una asimétrica distribución del c-di-GMP en la zona donde se localiza el flagelo y la maquinaria de quimiotaxis (Kulasekara *et al.*, 2013). O en *Streptomyces coelicolor*, donde este segundo mensajero regula la transición entre un micelio vegetativo a un micelio reproductivo (Tschowri *et al.*, 2014).

La regulación de la reprogramación de la expresión génica durante la transición de estilo de vida planctónico a sésil es una característica universal para el c-di-GMP, donde, en términos generales, bajos niveles de este segundo mensajero se asocian a una vida móvil mientras que altos niveles lleva a las bacterias a adherirse a superficies y formar biopelículas. Sin embargo, además de este “sencillo” cambio en el estilo de vida, el c-di-GMP está involucrado en la regulación de los complejos pasos que las bacterias llevan a cabo para colonizar superficies (Valentini & Filloux, 2016). Como se ha visto, la formación y ensamblaje del aparato flagelar es un proceso finamente regulado, perteneciendo a una estrategia adaptativa. Sin embargo, el control de la actividad del motor podría ser importante para la toma de una decisión rápida durante el proceso de formación de

biopelículas (Jenal *et al.*, 2017). Por ejemplo, se ha descrito tanto en *E. coli* como en *Salmonella entérica* que un aumento en los niveles intracelulares de este segundo mensajero resulta en la obstrucción del flagelo por la proteína de unión al c-di-GMP YcgR, generando un cambio en la velocidad de movimiento de la célula y en su actividad quimiotáctica. En cambio, para bloquear a YcgR y continuar con la vida móvil, estas bacterias expresan la PDE PdeH junto a otros genes flagelares. Este mecanismo afirma que el motor flagelar es capaz de responder a pequeños cambios de c-di-GMP fundamentales para comenzar la formación de biopelículas (Boehm *et al.*, 2010, Paul *et al.*, 2010). En los siguientes pasos implicados en este proceso también ha sido descrita la intervención de diferentes DGCs, que aumentan los niveles de c-di-GMP en la célula, así como la activación de diferentes proteínas sensoras (Christen *et al.*, 2006, Pultz *et al.*, 2012).

Como se ha comentado con anterioridad, una vez ha ocurrido el contacto con la superficie a colonizar se produce un rápido cambio en la expresión génica de la bacteria, comenzando a sintetizar adhesinas, activando orgánulos de movilidad en superficie y produciendo la matriz extracelular para proteger a las microcolonias en desarrollo. Todo este cambio adaptativo es controlado por el c-di-GMP a nivel transcripcional, transducional y postransducional (Steiner *et al.*, 2013, Kariisa *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha demostrado que el c-di-GMP regula el pili tipo IV en varias bacterias, como son *Myxococcus xanthus* o *V. cholerae* (Jones *et al.*, 2015, Skotnicka *et al.*, 2016).

Así como están bastante estudiados los mecanismos por los que el c-di-GMP influye en el proceso de transición de vida móvil a vida sésil, no se conoce tanto sobre su relación con el mecanismo contrario, la dispersión de las biopelículas y por tanto transición a vida móvil. Debido a su fundamental papel en la formación de biopelículas parece claro que el riguroso control de este segundo mensajero está también ligado al proceso de activación de dispersión de las biopelículas. Por ejemplo, en *P. fluorescens* ha sido descrito que la proteína de superficie LapA está implicada en la adhesión y estabilización a superficies y ligada a altos niveles de c-di-GMP intracelulares. En cambio, cuando estos niveles bajan es inactivada por la proteasa LapD que ha sido a su vez activada por una PDE (Chatterjee *et al.*, 2014). También en esta cepa, las proteínas DipA y BldA han sido descritas como integrantes en la señalización por c-di-GMP durante el proceso de dispersión de biopelículas (Li *et al.*, 2014).

Estos estudios parecen indicar que el c-di-GMP posee también un importante papel en la regulación de la transición de vida sésil a vida móvil.

En cuanto al proceso de virulencia bacteriano se sabe que el c-di-GMP controla el proceso de adherencia al hospedador, la secreción de factores de virulencia, citotoxicidad, invasión, resistencia a estrés oxidativo y modulación de la respuesta inmune de la célula infectada (Hall & Lee, 2018). Recientemente se ha ligado este segundo mensajero con los más importantes sistemas de virulencia, los factores de secreción tipo II, tipo III y tipo VI (Moscoso *et al.*, 2011, Roelofs *et al.*, 2015, Trampari *et al.*, 2015), generando la posibilidad de que el c-di-GMP regule este proceso de manera global.

Con todo lo explicado, parece claro que el c-di-GMP es capaz de controlar varios procesos biológicos a diferentes niveles, incluyendo transcripción, traducción y control alostérico. Todo esto hace que las bacterias tengan la habilidad de adaptarse rápidamente a condiciones ambientales cambiantes y ajustar su comportamiento sin la necesidad de sintetizar proteínas de nuevo (Jenal *et al.*, 2017).

A pesar de haberse cumplido ya 30 años de su descubrimiento y del arduo trabajo llevado a cabo por muchos grupos de investigación en todo el mundo, queda aún mucho por discernir acerca de la fina regulación del c-di-GMP. De hecho, solo se han descrito algunas vías de regulación completas (Römling *et al.*, 2013), siendo común que, en la mayoría de los casos, solo se hayan identificado componentes aislados. Además, resulta complicado conocer cuáles son las señales ambientales o celulares que afectan a estos circuitos y como afectan a la distribución espacio-temporal o en gradiente del c-di-GMP intracelular, a la flexibilidad conformacional de la propia molécula o a las interacciones entre proteínas implicadas en la regulación de sus niveles celulares (Krasteva *et al.*, 2012, Dahlstrom *et al.*, 2018). También es difícil estudiar la interacción que pueda existir con otros sistemas de regulación en los que intervienen otros segundos mensajeros nucleotídicos como el c-di-AMP, que promete tener similitud en complejidad de regulación con el c-di-GMP (Jenal *et al.*, 2017), así como con otros reguladores globales o con el proceso de QS bacteriano, todos ellos con un papel esencial en la respuesta y adaptación a cambios ambientales (Galperin, 2004, Pesavento & Hengge, 2009, Kalia *et al.*, 2014). Un reciente trabajo publicado por el grupo de Hengge identifica un nuevo modelo de señalización a nivel

local del c-di-GMP. En él, una única PDE, PdeH, es capaz de suprimir la acción de numerosas DGCs al eliminar el c-di-GMP acumulado en una zona celular, de manera que gracias a estos módulos de interacción de DGCs y PDEs la célula realizará una función u otra (Sarenko *et al.*, 2017).

El genoma de *P. fluorescens* F113 contiene genes que codifican más de 30 proteínas con dominios GGDEF, EAL, HD-GYP, PilZ y HDOD. Ha sido demostrada la implicación de algunas de ellas en los mecanismos de transducción de señal que regulan el movimiento, como son SadC, WspR, BifA y SadB (Navazo *et al.*, 2009, Martínez-Granero *et al.*, 2012). Mutantes en los genes *sadB* y *wspR*, codificantes para proteínas con dominio HDOD y DGC, respectivamente, se caracterizan por ser hipermóviles en comparación con la estirpe silvestre (Navazo *et al.*, 2009). Así mismo, dichos mutantes están enormemente afectados en la formación de biopelículas (Barahona *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la regulación de la formación de biopelículas por *P. fluorescens* F113 es dependiente de la actividad contraria de las DGCs SadC y WspR respecto de la PDE BifA que, dependiendo de las condiciones ambientales darán lugar a unos niveles de c-di-GMP que finalmente son detectados por la proteína de unión a c-di-GMP FlgZ (Martínez-Granero *et al.*, 2014a). FlgZ es una proteína con dominio PilZ localizada en un operón relacionado con la síntesis del aparato flagelar. Ha sido observado que su localización subcelular varía según la concentración del c-di-GMP intracelular. Cuando sus niveles son altos FlgZ se localiza en el polo celular mientras que cuando son bajos aparece distribuida de forma difusa por toda la célula. Este hecho indica que FlgZ interacciona con el motor flagelar cuando los niveles de c-di-GMP son altos, probablemente para generar cambios en la velocidad de movimiento y promoviendo la formación de biopelículas.

Además, como se detallará en los dos siguientes capítulos de esta Tesis doctoral, se han identificado más DGCs y PDEs en *P. fluorescens* F113 implicadas tanto en movilidad como en formación de biopelículas, estando además reguladas por la proteína AmrZ, regulador central de la respuesta ambiental en esta cepa, como se explica en el siguiente apartado (Muriel *et al.*, 2018). Así como la identificación de proteínas con dominio HDOD y posible función de unión al c-di-GMP.

4.5. AmrZ como regulador global de respuestas al ambiente

Como se ha ido viendo a lo largo de esta introducción, los factores implicados en una correcta colonización de la rizosfera son muchos, y dependen en la mayoría de los casos de la regulación de la respuesta al ambiente en el que se encuentren los microorganismos. Parte de esta respuesta está regulada por proteínas reguladoras globales de la respuesta ambiental. En la bibliografía podemos encontrar numerosas proteínas reguladoras globales de muchos procesos bacterianos, que son normalmente reguladores transcripcionales de unión a DNA y suelen clasificarse según el dominio de unión a DNA que presenten o según reciban señales externas o internas. Normalmente los genes diana de estos reguladores globales son a su vez activadores o represores de otros genes o procesos celulares (Madan Babu & Teichmann, 2003). Esta compleja red de regulación coordina el flujo de información a nivel intracelular dependiendo de las condiciones ambientales para permitir una respuesta acertada, o como dirían en inglés “*from input signal to output responses*” (Seshasayee *et al.*, 2006). Gracias a este mecanismo las células son capaces de adaptarse rápidamente a cambios en el ambiente (Balleza *et al.*, 2009).

AmrZ es una proteína reguladora perteneciente a la familia Arc cuyo dominio de unión al DNA es un atípico RHH (del inglés *Ribbon-Helix-Helix*), ya que es capaz tanto de reprimir como de activar la transcripción. Está presente en todos los genomas del género *Pseudomonas* secuenciados hasta la fecha y se ha descrito como un importante regulador global en *P. aeruginosa* y en *P. fluorescens* F113 (Jones *et al.*, 2014, Martínez-Granero *et al.*, 2014b). Fue descrito por primera vez en *P. aeruginosa* con el nombre de AlgZ debido a su papel en la regulación de la síntesis de alginato (Baynham & Wozniak, 1996). También se ha identificado como represor del polisacárido Psl (Jones *et al.*, 2013) y como regulador de la movilidad en esta cepa, cambiándose su nombre a AmrZ (del inglés, *alginate and motility regulator*) (Baynham *et al.*, 2006, Tart *et al.*, 2006).

La expresión de *amrZ* es dependiente del factor sigma AlgU (Wozniak *et al.*, 2003), el cual es esencial para el control de la respuesta ambiental a través de diferentes mecanismos en varias especies de *Pseudomonas* (Schenk *et al.*, 2008, Damron *et al.*, 2009, Chand *et al.*, 2012). Además, en *P. syringae* se ha descrito que AmrZ actúa como un represor transcripcional de la producción de celulosa a través también del c-di-GMP (Prada-Ramírez

et al., 2016). En *P. fluorescens* F113 AmrZ regula la movilidad dependiente de flagelo mediante la represión del activador transcripcional *fleQ* (ver figura 1.5). Mutantes en los genes *amrZ* y *algU* presentan un fenotipo hipermovil como consecuencia de la sobreproducción de los componentes flagelares (Martinez-Granero *et al.*, 2012).

La demostración de que AmrZ es un regulador global de las respuestas bacterianas a las condiciones ambientales vino determinada por los análisis por ChIP-Seq de AmrZ llevados a cabo tanto en *P. aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014) como en *P. fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2014b) que mostraron que AmrZ estaba implicado en múltiples mecanismos de adaptación al ambiente. En estos análisis observaron la unión de esta proteína a promotores de genes relacionados con la homeostasis del hierro, la virulencia, el movimiento y el c-di-GMP, entre otros.

Referencias

- Aarons S**, Abbas A, Adams C, Fenton A & O'Gara F (2000) A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of bacteriology* **182**: 3913-3919.
- Abraham JM**, Freitag CS, Clements JR & Eisenstein BI (1985) An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 5724-5727.
- Adler J** (1969) Chemoreceptors in bacteria. *Science* **166**: 1588-1597.
- Adler J & Epstein W** (1974) Phosphotransferase-system enzymes as chemoreceptors for certain sugars in *Escherichia coli* chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 2895-2899.
- Adler J**, Hazelbauer GL & Dahl MM (1973) Chemotaxis toward sugars in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **115**: 824-847.
- Alexander RP**, Lowenthal AC, Harshey RM & Ottemann KM (2010) CheV: CheW-like coupling proteins at the core of the chemotaxis signaling network. *Trends in microbiology* **18**: 494-503.
- Alexandre G** (2010) Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. *Microbiology* **156**: 2283-2293.
- Almario J**, Bruto M, Vacheron J, Prigent-Combaret C, Moenne-Loccoz Y & Muller D (2017) Distribution of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthetic Genes among the *Pseudomonas* spp. Reveals Unexpected Polyphyletism. *Frontiers in microbiology* **8**: 1218.
- Alsohim AS**, Taylor TB, Barrett GA, Gallie J, Zhang XX, Altamirano-Junqueira AE, Johnson LJ, Rainey PB & Jackson RW (2014) The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environmental microbiology* **16**: 2267-2281.
- Amikam D & Galperin MY** (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6.
- Anand GS & Stock AM** (2002) Kinetic basis for the stimulatory effect of phosphorylation on the methylesterase activity of CheB. *Biochemistry* **41**: 6752-6760.
- Andersson PF**, Levenfors J & Broberg A (2012) Metabolites from *Pseudomonas brassicacearum* with activity against the pink snow mould causing pathogen *Microdochium nivale*. *Biocontrol* **57**: 463-469.
- Appelt S & Heuner K** (2017) The Flagellar Regulon of Legionella-A Review. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **7**: 454.
- Aravind L & Koonin EV** (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in biochemical sciences* **23**: 469-472.
- Arora SK**, Ritchings BW, Almira EC, Lory S & Ramphal R (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *Journal of bacteriology* **179**: 5574-5581.
- Arora SK**, Ritchings BW, Almira EC, Lory S & Ramphal R (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FlhD, is responsible for mucin adhesion. *Infection and immunity* **66**: 1000-1007.
- Arseneault T**, Goyer C & Fillion M (2013) Phenazine production by *Pseudomonas* sp. LBUM223 contributes to the biological control of potato common scab. *Phytopathology* **103**: 995-1000.
- Babalola OO** (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology letters* **32**: 1559-1570.
- Bais HP**, Weir TL, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology* **57**: 233-266.
- Baker AE**, Diepold A, Kuchma SL, Scott JE, Ha DG, Orazi G, Armitage JP & O'Toole GA (2016) PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **198**: 1837-1846.
- Baker MD**, Wolanin PM & Stock JB (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**: 9-22.
- Bakker PA**, Pieterse CM & van Loon LC (2007) Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239-243.
- Bakker PA**, Berendsen RL, Doornbos RF, Wittermans PC & Pieterse CM (2013) The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science* **4**: 165.
- Balleza E**, Lopez-Bojorquez LN, Martinez-Antonio A, Resendis-Antonio O, Lozada-Chavez I, Balderas-Martinez YI, Encarnacion S & Collado-Vides J (2009) Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS microbiology reviews* **33**: 133-151.

- Barahona E**, Navazo A, Martinez-Granero F, Zea-Bonilla T, Perez-Jimenez RM, Martin M & Rivilla R (2011) *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Applied and environmental microbiology* **77**: 5412-5419.
- Barahona E**, Navazo A, Yousef-Coronado F, Aguirre de Carcer D, Martinez-Granero F, Espinosa-Urgel M, Martin M & Rivilla R (2010) Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environmental microbiology* **12**: 3185-3195.
- Barahona E**, Navazo A, Garrido-Sanz D, Muriel C, Martinez-Granero F, Redondo-Nieto M, Martin M & Rivilla R (2016) *Pseudomonas fluorescens* F113 Can Produce a Second Flagellar Apparatus, Which Is Important for Plant Root Colonization. *Frontiers in microbiology* **7**: 1471.
- Baraquet C & Harwood CS** (2013) Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 18478-18483.
- Baraquet C & Harwood CS** (2015) FleQ DNA Binding Consensus Sequence Revealed by Studies of FleQ-Dependent Regulation of Biofilm Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **198**: 178-186.
- Baraquet C**, Murakami K, Parsek MR & Harwood CS (2012) The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic acids research* **40**: 7207-7218.
- Bardgett RD & van der Putten WH** (2014) Belowground biodiversity and ecosystem functioning. *Nature* **515**: 505-511.
- Baynham PJ & Wozniak DJ** (1996) Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa* *algD* transcription. *Molecular microbiology* **22**: 97-108.
- Baynham PJ**, Ramsey DM, Gvozdyev BV, Cordonnier EM & Wozniak DJ (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *Journal of bacteriology* **188**: 132-140.
- Beauregard PB**, Chai Y, Vlamakis H, Losick R & Kolter R (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E1621-1630.
- Benach J**, Swaminathan SS, Tamayo R, et al. (2007) The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *The EMBO journal* **26**: 5153-5166.
- Berendsen RL**, Pieterse CM & Bakker PA (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science* **17**: 478-486.
- Berg HC** (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annual review of biochemistry* **72**: 19-54.
- Bianco C & Defez R** (2009) *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *Journal of experimental botany* **60**: 3097-3107.
- Bibikov SI**, Miller AC, Gosink KK & Parkinson JS (2004) Methylation-independent aerotaxis mediated by the *Escherichia coli* Aer protein. *Journal of bacteriology* **186**: 3730-3737.
- Bobrov AG**, Kirillina O, Forman S, Mack D & Perry RD (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environmental microbiology* **10**: 1419-1432.
- Boehm A**, Kaiser M, Li H, Spangler C, Kasper CA, Ackermann M, Kaever V, Sourjik V, Roth V & Jenal U (2010) Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* **141**: 107-116.
- Borst P** (2003) Mechanisms of antigenic variation: an overview. In: *Antigenic Variation*, pp. 1-15. Edited by A. Craig & A. Scherf. London (UK): Elsevier Academic Press.
- Boyd CD & O'Toole GA** (2012) Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annual review of cell and developmental biology* **28**: 439-462.
- Brazil GM**, Kenefick L, Callanan M, Haro A, de Lorenzo V, Dowling DN & O'Gara F (1995) Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bph* gene expression in the rhizosphere. *Applied and environmental microbiology* **61**: 1946-1952.
- Bren A & Eisenbach M** (2000) How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *Journal of bacteriology* **182**: 6865-6873.
- Briegleb A**, Ortega DR, Tocheva EI, et al. (2009) Universal architecture of bacterial chemoreceptor arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17181-17186.
- Briegleb A**, Li X, Bilwes AM, Hughes KT, Jensen GJ & Crane BR (2012) Bacterial chemoreceptor arrays are hexagonally packed trimers of receptor dimers networked by rings of kinase and coupling proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 3766-3771.

- Brown ME** (1974) Seed and root bacterization. *Annual Review of Phytopathology* **12**: 181-197
- Buee M**, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R & Becard G (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **13**: 693-698.
- Bulgarelli D**, Rott M, Schlaeppi K, *et al.* (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* **488**: 91-95.
- Bull CT**, Duffy B, Voisard C, Defago G, Keel C & Haas D (2001) Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 327-336.
- Busby PE**, Soman C, Wagner MR, Friesen ML, Kremer J, Bennett A, Morsy M, Eisen JA, Leach JE & Dangl JL (2017) Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS biology* **15**: e2001793.
- Caiazza NC & O'Toole GA** (2004) SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* **186**: 4476-4485.
- Caiazza NC**, Merritt JH, Brothers KM & O'Toole GA (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* **189**: 3603-3612.
- Caly DL**, Bellini D, Walsh MA, Dow JM & Ryan RP (2015) Targeting cyclic di-GMP signalling: a strategy to control biofilm formation? *Current pharmaceutical design* **21**: 12-24.
- Capdevila S**, Martinez-Granero FM, Sanchez-Contreras M, Rivilla R & Martin M (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889-3897.
- Ceballos I**, Ruiz M, Fernandez C, Pena R, Rodriguez A & Sanders IR (2013) The in vitro mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *PLoS one* **8**: e70633.
- Contreras-Cornejo HA**, Macias-Rodriguez L, del-Val E & Larsen J (2016) Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS microbiology ecology* **92**: fiw036.
- Costerton JW** (1999) Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents* **11**: 217-221; discussion 237-219.
- Couillerot O**, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J & Moenne-Loccoz Y (2009) *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in applied microbiology* **48**: 505-512.
- Criss AK**, Kline KA & Seifert HS (2005) The frequency and rate of pilin antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Molecular microbiology* **58**: 510-519.
- Cronin D**, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN & O'Gara F (1997a) Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol in the Interactions of the Biocontrol Pseudomonad Strain F113 with the Potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and environmental microbiology* **63**: 1357-1361.
- Cronin D**, Moenne-Loccoz T, Fenton A, Dunne C, Dowling DN & O'Gara F (1997b) Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol Ecol* **23(2)**:95-106
- Chambers JR**, Liao J, Schurr MJ & Sauer K (2014) BrIR from *Pseudomonas aeruginosa* is a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular microbiology* **92**: 471-487.
- Chan C**, Paul R, Samoray D, Amiot NC, Giese B, Jenal U & Schirmer T (2004) Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17084-17089.
- Chancey ST**, Wood DW, Pierson EA & Pierson LS, 3rd (2002) Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Applied and environmental microbiology* **68**: 3308-3314.
- Chand NS**, Clatworthy AE & Hung DT (2012) The two-component sensor KinB acts as a phosphatase to regulate *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Journal of bacteriology* **194**: 6537-6547.
- Chao X**, Muff TJ, Park SY, Zhang S, Pollard AM, Ordal GW, Bilwes AM & Crane BR (2006) A receptor-modifying deamidase in complex with a signaling phosphatase reveals reciprocal regulation. *Cell* **124**: 561-571.
- Chatterjee D**, Cooley RB, Boyd CD, Mehl RA, O'Toole GA & Sondermann H (2014) Mechanistic insight into the conserved allosteric regulation of periplasmic proteolysis by the signaling molecule cyclic-di-GMP. *eLife* **3**: e03650.

- Che FS**, Nakajima Y, Tanaka N, Iwano M, Yoshida T, Takayama S, Kadota I & Isogai A (2000) Flagellin from an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* induces a resistance response in cultured rice cells. *The Journal of biological chemistry* **275**: 32347-32356.
- Chin-A-Woeng TFC**, De Priester W, Van Der Bij AJ & Lugtenberg BJJ (1997) Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 79-86.
- Chin CY**, Monack DM & Nathan S (2010) Genome wide transcriptome profiling of a murine acute melioidosis model reveals new insights into how *Burkholderia pseudomallei* overcomes host innate immunity. *BMC genomics* **11**: 672.
- Chou SH & Galperin MY** (2016) Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *Journal of bacteriology* **198**: 32-46.
- Christen B**, Christen M, Paul R, Schmid F, Folcher M, Jenoe P, Meuwly M & Jenal U (2006) Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *The Journal of biological chemistry* **281**: 32015-32024.
- Christen M**, Christen B, Allan MG, Folcher M, Jenoe P, Grzesiek S & Jenal U (2007) DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 4112-4117.
- Christen M**, Kulasekara HD, Christen B, Kulasekara BR, Hoffman LR & Miller SI (2010) Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division. *Science* **328**: 1295-1297.
- Dahlstrom KM**, Giglio KM, Collins AJ, Sondermann H & O'Toole GA (2015) Contribution of Physical Interactions to Signaling Specificity between a Diguanylate Cyclase and Its Effector. *mBio* **6**: e01978-01915.
- Dahlstrom KM**, Giglio KM, Sondermann H & O'Toole GA (2016) The Inhibitory Site of a Diguanylate Cyclase Is a Necessary Element for Interaction and Signaling with an Effector Protein. *Journal of bacteriology* **198**: 1595-1603.
- Dahlstrom KM**, Collins AJ, Doing G, Taroni JN, Gauvin TJ, Greene CS, Hogan DA & O'Toole GA (2018) A Multimodal Strategy Used By A Large c-di-GMP Network. *Journal of bacteriology*.
- Damron FH**, Napper J, Teter MA & Yu HD (2009) Lipotoxin F of *Pseudomonas aeruginosa* is an AlgU-dependent and alginate-independent outer membrane protein involved in resistance to oxidative stress and adhesion to A549 human lung epithelia. *Microbiology* **155**: 1028-1038.
- Darias JA**, García-Fontana C, Lugo AC, Rico-Jiménez M & Krell T. (2014) Qualitative and quantitative assays for flagellum-mediated chemotaxis. *Methods Mol. Biol.* **1149**: 87-97.
- Dasgupta N & Ramphal R** (2001) Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **183**: 6636-6644.
- Dasgupta N**, Ferrell EP, Kanack KJ, West SE & Ramphal R (2002) *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Journal of bacteriology* **184**: 5240-5250.
- Dasgupta N**, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S & Ramphal R (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **50**: 809-824.
- de Cárcer DA**, Martin M, Mackova M, Macek T, Karlson U & Rivilla R (2007a) The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *The ISME journal* **1**: 215-223.
- de Cárcer DA**, Martin M, Karlson U & Rivilla R (2007b) Changes in bacterial populations and in biphenyl dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of willow trees for rhizoremediation. *Applied and environmental microbiology* **73**: 6224-6232.
- de Gregorio PR**, Michavila G, Ricciardi Muller L, de Souza Borges C, Pomares MF, Saccol de Sa EL, Pereira C & Vincent PA (2017) Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants. *PloS one* **12**: e0176930.
- De N**, Navarro MV, Raghavan RV & Sondermann H (2009) Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *Journal of molecular biology* **393**: 619-633.
- de Souza JT**, Mazzola M & Raaijmakers JM (2003) Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology* **5**: 1328-1340.
- de Weert S**, Vermeiren H, Mulders IH, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R & Lugtenberg BJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for

tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **15**: 1173-1180.

de Weert S, Dekkers LC, Bitter W, Tuinman S, Wijfjes AH, van Boxtel R & Lugtenberg BJ (2006) The two-component colR/S system of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 plays a role in rhizosphere competence through maintaining the structure and function of the outer membrane. *FEMS microbiology ecology* **58**: 205-213.

de Weger LA, van der Vlugt CI, Wijfjes AH, Bakker PA, Schippers B & Lugtenberg B (1987) Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *Journal of bacteriology* **169**: 2769-2773.

Dekkers LC, Phoelich CC, van der Fits L & Lugtenberg BJ (1998) A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7051-7056.

Delgado-Baquerizo M, Eldridge DJ, Ochoa V, Gozalo B, Singh BK & Maestre FT (2017) Soil microbial communities drive the resistance of ecosystem multifunctionality to global change in drylands across the globe. *Ecology letters* **20**: 1295-1305.

Delgado-Baquerizo M, Oliverio AM, Brewer TE, Benavent-Gonzalez A, Eldridge DJ, Bardgett RD, Maestre FT, Singh BK & Fierer N (2018) A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* **359**: 320-325.

Dubey BN, Lori C, Ozaki S, Fucile G, Plaza-Menacho I, Jenal U & Schirmer T (2016) Cyclic di-GMP mediates a histidine kinase/phosphatase switch by noncovalent domain cross-linking. *Science advances* **2**: e1600823.

Duffy BK & Defago G (2000) Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and environmental microbiology* **66**: 3142-3150.

Dutta S & Podile AR (2010) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical reviews in microbiology* **36**: 232-244.

Dybvig K (1993) DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Molecular microbiology* **10**: 465-471.

Elser JJ, Bracken ME, Cleland EE, Gruner DS, Harpole WS, Hillebrand H, Ngai JT, Seabloom EW, Shurin JB & Smith JE (2007) Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology letters* **10**: 1135-1142.

Espinosa-Urgel M, Salido A & Ramos JL (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of bacteriology* **182**: 2363-2369.

Espinosa-Urgel M (2004) Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid* **52**: 139-150.

Falke JJ & Hazelbauer GL (2001) Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends in biochemical sciences* **26**: 257-265.

Fan B, Carvalhais LC, Becker A, Fedoseyenko D, von Wiren N & Borriss R (2012) Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC microbiology* **12**: 116.

Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M & O'Gara F (1992) Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and environmental microbiology* **58**: 3873-3878.

Fernandez M, Ortega A, Rico-Jimenez M, Martin-Mora D, Daddaoua A, Matilla MA & Krell T (2018) High-Throughput Screening to Identify Chemoreceptor Ligands. *Methods in molecular biology* **1729**: 291-301.

Ferrandez A, Hawkins AC, Summerfield DT & Harwood CS (2002) Cluster II che genes from *Pseudomonas aeruginosa* are required for an optimal chemotactic response. *Journal of bacteriology* **184**: 4374-4383.

Ferris HU & Minamino T (2006) Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends in microbiology* **14**: 519-526.

Fierer N, Leff JW, Adams BJ, Nielsen UN, Bates ST, Lauber CL, Owens S, Gilbert JA, Wall DH & Caporaso JG (2012) Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 21390-21395.

Finlay RD (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of experimental botany* **59**: 1115-1126.

Fredrick KL & Helmann JD (1994) Dual chemotaxis signaling pathways in *Bacillus subtilis*: a sigma D-dependent gene encodes a novel protein with both CheW and CheY homologous domains. *Journal of bacteriology* **176**: 2727-2735.

- Fulcher NB**, Holliday PM, Klem E, Cann MJ & Wolfgang MC (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* Chp chemosensory system regulates intracellular cAMP levels by modulating adenylate cyclase activity. *Molecular microbiology* **76**: 889-904.
- Fuqua WC**, Winans SC & Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* **176**: 269-275.
- Gal M**, Preston GM, Massey RC, Spiers AJ & Rainey PB (2003) Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Molecular ecology* **12**: 3109-3121.
- Galperin MY** (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental microbiology* **6**: 552-567.
- Galperin MY** (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of bacteriology* **188**: 4169-4182.
- Gallique M**, Bouteiller M & Merieau A (2017) The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? *Frontiers in microbiology* **8**: 1454.
- Garrido-Sanz D**, Meier-Kolthoff JP, Goker M, Martin M, Rivilla R & Redondo-Nieto M (2016) Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PloS one* **11**: e0150183.
- Garrido-Sanz D**, Arrebola E, Martinez-Granero F, Garcia-Mendez S, Muriel C, Blanco-Romero E, Martin M, Rivilla R & Redondo-Nieto M (2017) Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers. *Frontiers in microbiology* **8**: 413.
- Geisen S**, Rosengarten J, Koller R, Mulder C, Urich T & Bonkowski M (2015) Pack hunting by a common soil amoeba on nematodes. *Environmental microbiology* **17**: 4538-4546.
- Goljanian-Tabrizi S**, Amiri S, Nikaein D & Motesharrei Z (2016) The comparison of five low cost liquid formulations to preserve two phosphate solubilizing bacteria from the genera *Pseudomonas* and *Pantoea*. *Iranian journal of microbiology* **8**: 377-382.
- Gomila M**, Pena A, Mulet M, Lalucat J & Garcia-Valdes E (2015) Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in microbiology* **6**: 214.
- Gordillo F**, Chavez FP & Jerez CA (2007) Motility and chemotaxis of *Pseudomonas* sp. B4 towards polychlorobiphenyls and chlorobenzoates. *FEMS microbiology ecology* **60**: 322-328.
- Grimm AC & Harwood CS** (1999) NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene. *Journal of bacteriology* **181**: 3310-3316.
- Gupta P**, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S & Tribedi P (2016) Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. *Archives of microbiology* **198**: 1-15.
- Güvener ZT & Harwood CS** (2007) Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular microbiology* **66**: 1459-1473.
- Haas D & Defago G** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews Microbiology* **3**: 307-319.
- Haichar FZ**, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T & Achouak W (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME journal* **2**: 1221-1230.
- Hall-Stoodley L**, Costerton JW & Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology* **2**: 95-108.
- Hall CL & Lee VT** (2018) Cyclic-di-GMP regulation of virulence in bacterial pathogens. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **9**.
- Hamer R**, Chen PY, Armitage JP, Reinert G & Deane CM (2010) Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. *BMC systems biology* **4**: 3.
- Harshey RM** (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual review of microbiology* **57**: 249-273.
- Harwood CS** (1989) A methyl-accepting protein is involved in benzoate taxis in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* **171**: 4603-4608.
- Henderson IR**, Owen P & Nataro JP (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Molecular microbiology* **33**: 919-932.
- Hendrixson DR & DiRita VJ** (2004) Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular microbiology* **52**: 471-484.
- Hickman JW**, Tifrea DF & Harwood CS (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 14422-14427.

- Hinsa SM**, Espinosa-Urgel M, Ramos JL & O'Toole GA (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular microbiology* **49**: 905-918.
- Hirano T**, Minamino T & Macnab RM (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *Journal of molecular biology* **312**: 359-369.
- Howie WJ**, Cook RJ & Weller DM (1987) Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*. **77**: 286-292.
- Hurlow J**, Couch K, Laforet K, Bolton L, Metcalf D & Bowler P (2015) Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. *Advances in wound care* **4**: 295-301.
- Irie Y**, Starkey M, Edwards AN, Wozniak DJ, Romeo T & Parsek MR (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Molecular microbiology* **78**: 158-172.
- Jacobsen CS & Hjelmso MH** (2014) Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current opinion in biotechnology* **27**: 15-20.
- Jafrá S**, Przysowa J, Czajkowski R, Michta A, Garbeva P & van der Wolf JM (2006) Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Canadian journal of microbiology* **52**: 1006-1015.
- Jang MS**, Goo E, An JH, Kim J & Hwang I (2014) Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in *Burkholderia glumae*. *PLoS one* **9**: e84831.
- Jenal U**, Reinders A & Lori C (2017) Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature reviews Microbiology* **15**: 271-284.
- Jeong HH**, Lee SH, Kim JM, Kim HE, Kim YG, Yoo JY, Chang WS & Lee CS (2010) Microfluidic monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis under the continuous chemical gradient. *Biosensors & bioelectronics* **26**: 351-356.
- Jones CJ**, Ryder CR, Mann EE & Wozniak DJ (2013) AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon. *Journal of bacteriology* **195**: 1637-1644.
- Jones CJ**, Newsom D, Kelly B, *et al.* (2014) ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **10**: e1003984.
- Jones CJ**, Utada A, Davis KR, Thongsomboon W, Zamorano Sanchez D, Banakar V, Cegelski L, Wong GC & Yildiz FH (2015) C-di-GMP Regulates Motile to Sessile Transition by Modulating MshA Pili Biogenesis and Near-Surface Motility Behavior in *Vibrio cholerae*. *PLoS pathogens* **11**: e1005068.
- Jones CM**, Welsh A, Throback IN, Dorsch P, Bakken LR & Hallin S (2011) Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne N₂- and N₂O-producing Bacillus isolates harboring the *nosZ* gene. *FEMS microbiology ecology* **76**: 541-552.
- Jyot J**, Dasgupta N & Ramphal R (2002) FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. *Journal of bacteriology* **184**: 5251-5260.
- Kalia VC**, Wood TK & Kumar P (2014) Evolution of resistance to quorum-sensing inhibitors. *Microbial ecology* **68**: 13-23.
- Kang Y**, Shen M, Wang H & Zhao Q (2013) A possible mechanism of action of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure. *The Journal of general and applied microbiology* **59**: 267-277.
- Kariisa AT**, Weeks K & Tamayo R (2016) The RNA Domain Vc1 Regulates Downstream Gene Expression in Response to Cyclic Diguanylate in *Vibrio cholerae*. *PLoS one* **11**: e0148478.
- Karlson U**, Dowling D, O'Gara F, Rivilla R, Bittens M, Francesconi S, Pritchard H & Pedersen HC (1998) Development of self-contained plant/GMM systems for soil bioremediation. In: Past, Present and Future Risk Assessment when using GMOs (eds de Vries G.E.) Overschild, NL: ProBio Partners. pp. 23-31.
- Kato J**, Nakamura T, Kuroda A & Ohtake H (1999) Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **63**: 155-161.
- Kato J**, Kim HE, Takiguchi N, Kuroda A & Ohtake H (2008) *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *Journal of bioscience and bioengineering* **106**: 1-7.
- Katsuragi Y**, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T & Che FS (2015) CD2-1, the C-Terminal Region of Flagellin, Modulates the Induction of Immune Responses in Rice. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **28**: 648-658.

- Kay E**, Dubuis C & Haas D (2005) Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 17136-17141.
- Keel C**, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D & Défago G (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 4-13.
- Keller JB & Rubinow SI** (1976) Swimming of flagellated microorganisms. *Biophysical journal* **16**: 151-170.
- Kelly-Wintenberg K & Montie TC** (1994) Chemotaxis to oligopeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* **60**: 363-367.
- Kiely PD**, Haynes JM, Higgins CH, Franks A, Mark GL, Morrissey JP & O'Gara F (2006) Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microbial ecology* **51**: 257-266.
- Kim YK & McCarter LL** (2007) ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* **189**: 4094-4107.
- Klausen M**, Aaes-Jorgensen A, Molin S & Tolker-Nielsen T (2003) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular microbiology* **50**: 61-68.
- Klausen M**, Gjermansen M, Kreft JU & Tolker-Nielsen T (2006) Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS microbiology letters* **261**: 1-11.
- Kloepper JW. & Schroth MN** (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: *In Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Ed. Station de Pathologic Vegetal et Phytobacteriologic Angers, France, Vol. 2, pp. 879-882.
- Kloepper JW**, Lifshitz R & Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**: 39-44.
- Knief C** (2014) Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Frontiers in plant science* **5**: 216.
- Krasteva PV**, Giglio KM & Sondermann H (2012) Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein science : a publication of the Protein Society* **21**: 929-948.
- Krell T** (2015) Tackling the bottleneck in bacterial signal transduction research: high-throughput identification of signal molecules. *Molecular microbiology* **96**: 685-688.
- Kuchma SL**, Brothers KM, Merritt JH, Liberati NT, Ausubel FM & O'Toole GA (2007) BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* **189**: 8165-8178.
- Kulasekara BR**, Kamischke C, Kulasekara HD, Christen M, Wiggins PA & Miller SI (2013) c-di-GMP heterogeneity is generated by the chemotaxis machinery to regulate flagellar motility. *eLife* **2**: e01402.
- Kupferschmied P**, Maurhofer M & Keel C (2013) Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. *Frontiers in plant science* **4**: 287.
- Kuroda A**, Kumano T, Taguchi K, Nikata T, Kato J & Ohtake H (1995) Molecular cloning and characterization of a chemotactic transducer gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **177**: 7019-7025.
- Kyselkova M**, Kopecky J, Frapolli M, Defago G, Sagova-Mareckova M, Grundmann GL & Moenne-Loccoz Y (2009) Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. *The ISME journal* **3**: 1127-1138.
- Lacal J**, Alfonso C, Liu X, Parales RE, Morel B, Conejero-Lara F, Rivas G, Duque E, Ramos JL & Krell T (2010) Identification of a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates: differential chemotactic response towards receptor ligands. *The Journal of biological chemistry* **285**: 23126-23136.
- Lai TH**, Kumagai Y, Hyodo M, Hayakawa Y & Rikihisa Y (2009) The *Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. *Journal of bacteriology* **191**: 693-700.
- Lally RD**, Galbally P, Moreira AS, Spink J, Ryan D, Germaine KJ & Dowling DN (2017) Application of Endophytic *Pseudomonas fluorescens* and a Bacterial Consortium to *Brassica napus* Can Increase Plant Height and Biomass under Greenhouse and Field Conditions. *Frontiers in plant science* **8**: 2193.
- Lapouge K**, Sineva E, Lindell M, Starke K, Baker CS, Babitzke P & Haas D (2007) Mechanism of *hcnA* mRNA recognition in the Gac/Rsm signal transduction pathway of *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular microbiology* **66**: 341-356.
- Lasa I** (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **9**: 21-28.

- Lauber CL**, Hamady M, Knight R & Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and environmental microbiology* **75**: 5111-5120.
- Leduc JL & Roberts GP** (2009) Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. *Journal of bacteriology* **191**: 7121-7122.
- Lee HM**, Liao CT, Chiang YC, Chang YY, Yeh YT, Du SC & Hsiao YM (2016) Characterization of genes encoding proteins containing HD-related output domain in *Xanthomonas campestris* pv. campestris. *Antonie van Leeuwenhoek* **109**: 509-522.
- Lee VT**, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa Y & Lory S (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular microbiology* **65**: 1474-1484.
- León R & Espin G** (2008) *flhDC*, but not *fleQ*, regulates flagella biogenesis in *Azotobacter vinelandii*, and is under AlgU and CydR negative control. *Microbiology* **154**: 1719-1728.
- Lerouge I & Vanderleyden J** (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS microbiology reviews* **26**: 17-47.
- Lewis TA**, Leach L, Morales S, Austin PR, Hartwell HJ, Kaplan B, Forker C & Meyer JM (2004) Physiological and molecular genetic evaluation of the dechlorination agent, pyridine-2,6-bis(monothiocarboxylic acid) (PDTC) as a secondary siderophore of *Pseudomonas*. *Environmental microbiology* **6**: 159-169.
- Li Y**, Petrova OE, Su S, Lau GW, Panmanee W, Na R, Hassett DJ, Davies DG & Sauer K (2014) BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **10**: e1004168.
- Liu X & Parales RE** (2009) Bacterial chemotaxis to atrazine and related s-triazines. *Applied and environmental microbiology* **75**: 5481-5488.
- Liu YF**, Liao CT, Song WL, Hsu PC, Du SC, Lo HH & Hsiao YM (2013) GsmR, a response regulator with an HD-related output domain in *Xanthomonas campestris*, is positively controlled by Clp and is involved in the expression of genes responsible for flagellum synthesis. *The FEBS journal* **280**: 199-213.
- Loper JE**, Hassan KA, Mavrodi DV, *et al.* (2012) Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS genetics* **8**: e1002784.
- Lugtenberg BJ**, Dekkers L & Bloemberg GV (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual review of phytopathology* **39**: 461-490.
- Lugtenberg B & Kamilova F** (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology* **63**: 541-556.
- Lundberg DS**, Lebeis SL, Paredes SH, *et al.* (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**: 86-90.
- Luo Y**, Chen B, Zhou J, Sintim HO & Dayie TK (2014) E88, a new cyclic-di-GMP class I riboswitch aptamer from *Clostridium tetani*, has a similar fold to the prototypical class I riboswitch, Vc2, but differentially binds to c-di-GMP analogs. *Molecular bioSystems* **10**: 384-390.
- Lloyd SA**, Tang H, Wang X, Billings S & Blair DF (1996) Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *Journal of bacteriology* **178**: 223-231.
- Macnab RM** (2003) How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology* **57**: 77-100.
- Madan Babu M & Teichmann SA** (2003) Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* **31**: 1234-1244.
- Martin-Mora D**, Ortega A, Reyes-Darias JA, Garcia V, Lopez-Farfan D, Matilla MA & Krell T (2016) Identification of a Chemoreceptor in *Pseudomonas aeruginosa* That Specifically Mediates Chemotaxis Toward alpha-Ketoglutarate. *Frontiers in microbiology* **7**: 1937.
- Martinez-Gil M**, Yousef-Coronado F & Espinosa-Urgel M (2010) LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. *Molecular microbiology* **77**: 549-561.
- Martinez-Granero F**, Capdevila S, Sanchez-Contreras M, Martin M & Rivilla R (2005) Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* **151**: 975-983.
- Martinez-Granero F**, Rivilla R & Martin M (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Applied and environmental microbiology* **72**: 3429-3434.

- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS one* **7**: e31765.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Gonzalez de Heredia E, Baena I, Martin-Martin I, Rivilla R & Martin M (2014a) Identification of *flgZ* as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PLoS one* **9**: e87608.
- Martinez-Granero F**, Redondo-Nieto M, Vesga P, Martin M & Rivilla R (2014b) AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaptation in *P. fluorescens* F113. *BMC genomics* **15**: 237.
- Matilla MA**, Espinosa-Urgel M, Rodriguez-Herva JJ, Ramos JL & Ramos-Gonzalez MI (2007) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome biology* **8**: R179.
- Matilla MA & Krell T** (2017) Chemoreceptor-based signal sensing. *Current opinion in biotechnology* **45**: 8-14.
- Matsuyama BY**, Krasteva PV, Baraquet C, Harwood CS, Sondermann H & Navarro MV (2016) Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: E209-218.
- Mauchline TH & Malone JG** (2017) Life in earth - the root microbiome to the rescue? *Current opinion in microbiology* **37**: 23-28.
- Mazurier S**, Merieau A, Bergeau D, *et al.* (2015) Type III secretion system and virulence markers highlight similarities and differences between human- and plant-associated pseudomonads related to *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Applied and environmental microbiology* **81**: 2579-2590.
- McCarter LL** (2006) Regulation of flagella. *Current opinion in microbiology* **9**: 180-186.
- Meena M**, Gupta SK, Swapnil P, Zehra A, Dubey MK & Upadhyay RS (2017) Alternaria Toxins: Potential Virulence Factors and Genes Related to Pathogenesis. *Frontiers in microbiology* **8**: 1451.
- Mendes R**, Garbeva P & Raaijmakers JM (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews* **37**: 634-663.
- Mendes R**, Kruijt M, de Bruijn I, *et al.* (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* **332**: 1097-1100.
- Merritt JH**, Brothers KM, Kuchma SL & O'Toole GA (2007) SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of bacteriology* **189**: 8154-8164.
- Miller LD**, Yost CK, Hynes MF & Alexandre G (2007) The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is essential for competitive nodulation. *Molecular microbiology* **63**: 348-362.
- Minamino T & Namba K** (2004) Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **7**: 5-17.
- Moenne-Loccoz Y**, Tichy HV, O'Donnell A, Simon R & O'Gara F (2001) Impact of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 on intraspecific diversity of resident culturable fluorescent pseudomonads associated with the roots of field-grown sugar beet seedlings. *Applied and environmental microbiology* **67**: 3418-3425.
- Molina-Henares MA**, Ramos-Gonzalez MI, Daddaoua A, Fernandez-Escamilla AM & Espinosa-Urgel M (2017) FleQ of *Pseudomonas putida* KT2440 is a multimeric cyclic diguanylate binding protein that differentially regulates expression of biofilm matrix components. *Research in microbiology* **168**: 36-45.
- Moreira Fda S**, Costa PB, Souza R, Beneduzi A, Lisboa BB, Vargas LK & Passaglia LM (2016) Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *Genetics and molecular biology* **39**: 111-121.
- Morgan JA**, Bending GD & White PJ (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of experimental botany* **56**: 1729-1739.
- Morton A** (1981) History of botanical science; an account of the development of botany from ancient times to the present day. *Academy Press, London, UK*.
- MoscOSO JA**, Mikkelsen H, Heeb S, Williams P & Filloux A (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environmental microbiology* **13**: 3128-3138.
- Muller DB**, Vogel C, Bai Y & Vorholt JA (2016) The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. *Annual review of genetics* **50**: 211-234.
- Muriel C**, Jalvo B, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2015) Chemotactic Motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. *PLoS one* **10**: e0132242.

- Muriel C**, Arrebola E, Redondo-Nieto M, *et al.* (2018) AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Scientific reports* **8**: 1979.
- Murray TS & Kazmierczak BI** (2006) FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **188**: 6995-7004.
- Nadell CD**, Xavier JB & Foster KR (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews* **33**: 206-224.
- Naseby DC & Lynch JM** (1999) Effects of *Pseudomonas fluorescens* F113 on Ecological Functions in the Pea Rhizosphere Are Dependent on pH. *Microbial ecology* **37**: 248-256.
- Navarro MV**, De N, Bae N, Wang Q & Sondermann H (2009) Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure* **17**: 1104-1116.
- Navazo A**, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martinez-Granero F, Rivilla R & Martin M (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial biotechnology* **2**: 489-498.
- Neal AL**, Ahmad S, Gordon-Weeks R & Ton J (2012) Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PloS one* **7**: e35498.
- Neal AL & Ton J** (2013) Systemic defense priming by *Pseudomonas putida* KT2440 in maize depends on benzoxazinoid exudation from the roots. *Plant signaling & behavior* **8**: e22655.
- Newman MM**, Lorenz N, Hoilett N, Lee NR, Dick RP, Liles MR, Ramsier C & Kloepper JW (2016) Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *The Science of the total environment* **553**: 32-41.
- O'Toole GA & Kolter R** (1998a) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* **28**: 449-461.
- O'Toole GA & Kolter R** (1998b) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology* **30**: 295-304.
- Oku S**, Komatsu A, Tajima T, Nakashimada Y & Kato J (2012) Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization. *Microbes and environments* **27**: 462-469.
- Oku S**, Komatsu A, Nakashimada Y, Tajima T & Kato J (2014) Identification of *Pseudomonas fluorescens* chemotaxis sensory proteins for malate, succinate, and fumarate, and their involvement in root colonization. *Microbes and environments* **29**: 413-419.
- Oldroyd GE** (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature reviews Microbiology* **11**: 252-263.
- Oliveira MC**, Teixeira RD, Andrade MO, Pinheiro GM, Ramos CH & Farah CS (2015) Cooperative substrate binding by a diguanylate cyclase. *Journal of molecular biology* **427**: 415-432.
- Oliverio AM**, Bradford MA & Fierer N (2017) Identifying the microbial taxa that consistently respond to soil warming across time and space. *Global change biology* **23**: 2117-2129.
- Ortega A**, Zhulin IB & Krell T (2017) Sensory Repertoire of Bacterial Chemoreceptors. *Microbiology and molecular biology reviews* : **MMBR** **81**.
- Ortiz-Castro R**, Diaz-Perez C, Martinez-Trujillo M, del Rio RE, Campos-Garcia J & Lopez-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 7253-7258.
- Palleroni NJ** (2008) The roas to the taxonomy of *Pseumonas*. In: *Pseudomonas: Genomics and molecular biology*. Ed. Cornelis Hethersett, UK: Caister Acad Press, pp 1-18.
- Pandza S**, Baetens M, Park CH, Au T, Keyhan M & Matin A (2000) The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Molecular microbiology* **36**: 414-423.
- Parales RE**, Ditty JL & Harwood CS (2000) Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and environmental microbiology* **66**: 4098-4104.
- Park SF**, Purdy D & Leach S (2000) Localized reversible frameshift mutation in the *flhA* gene confers phase variability to flagellin gene expression in *Campylobacter coli*. *Journal of bacteriology* **182**: 207-210.
- Park YS**, Dutta S, Ann M, Raaijmakers JM & Park K (2015) Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and biophysical research communications* **461**: 361-365.
- Parker JE** (2003) Plant recognition of microbial patterns. *Trends in plant science* **8**: 245-247.

- Parkinson JS**, Hazelbauer GL & Falke JJ (2015) Signaling and sensory adaptation in *Escherichia coli* chemoreceptors: 2015 update. *Trends in microbiology* **23**: 257-266.
- Parte AC** (2014) LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research* **42**: D613-616.
- Paul K**, Nieto V, Carlquist WC, Blair DF & Harshey RM (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Molecular cell* **38**: 128-139.
- Pechy-Tarr M**, Bruck DJ, Maurhofer M, Fischer E, Vogne C, Henkels MD, Donahue KM, Grunder J, Loper JE & Keel C (2008) Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental microbiology* **10**: 2368-2386.
- Peiffer JA**, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES & Ley RE (2013) Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 6548-6553.
- Perez-Jaramillo JE**, Mendes R & Raaijmakers JM (2016) Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant molecular biology* **90**: 635-644.
- Pesavento C & Hengge R** (2009) Bacterial nucleotide-based second messengers. *Current opinion in microbiology* **12**: 170-176.
- Petrova OE & Sauer K** (2012) Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of bacteriology* **194**: 2413-2425.
- Philippot L**, Raaijmakers JM, Lemanceau P & van der Putten WH (2013) Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature reviews Microbiology* **11**: 789-799.
- Pieterse CM**, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC & Bakker PA (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology* **52**: 347-375.
- Pineda-Molina E**, Reyes-Darias JA, Lacal J, Ramos JL, Garcia-Ruiz JM, Gavira JA & Krell T (2012) Evidence for chemoreceptors with bimodular ligand-binding regions harboring two signal-binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 18926-18931.
- Pliego C**, Cazorla FM, Gonzalez-Sanchez MA, Perez-Jimenez RM, de Vicente A & Ramos C (2007) Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in microbiology* **158**: 463-470.
- Pliego C**, de Weert S, Lamers G, de Vicente A, Bloemberg G, Cazorla FM & Ramos C (2008) Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia necatrix* hyphae. *Environmental microbiology* **10**: 3295-3304.
- Poggio S**, Abreu-Goodger C, Fabela S, Osorio A, Dreyfus G, Vinuesa P & Camarena L (2007) A complete set of flagellar genes acquired by horizontal transfer coexists with the endogenous flagellar system in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* **189**: 3208-3216.
- Poonguzhali S**, Madhaiyan M, Yim WJ, Kim KA & Sa TM (2008) Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. *Applied microbiology and biotechnology* **78**: 1033-1043.
- Porter SL**, Wadhams GH & Armitage JP (2008) *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signalling. *Trends in microbiology* **16**: 251-260.
- Porter SL**, Wadhams GH & Armitage JP (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature reviews Microbiology* **9**: 153-165.
- Prada-Ramirez HA**, Perez-Mendoza D, Felipe A, Martinez-Granero F, Rivilla R, Sanjuan J & Gallegos MT (2016) AmrZ regulates cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular microbiology* **99**: 960-977.
- Pratt JT**, Tamayo R, Tischler AD & Camilli A (2007) PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *The Journal of biological chemistry* **282**: 12860-12870.
- Pratt LA & Kolter R** (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology* **30**: 285-293.
- Pultz IS**, Christen M, Kulasekara HD, Kennard A, Kulasekara B & Miller SI (2012) The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Molecular microbiology* **86**: 1424-1440.
- Raaijmakers JM**, De Bruijn I, Nybroe O & Ongena M (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews* **34**: 1037-1062.
- Ramirez KS**, Leff JW, Barberan A, et al. (2014) Biogeographic patterns in below-ground diversity in New York City's Central Park are similar to those observed globally. *Proceedings Biological sciences* **281**.

- Rasamiravaka T**, Labtani Q, Duez P & El Jaziri M (2015) The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international* **2015**: 759348.
- Redondo-Nieto M**, Lloret J, Larenas J, Barahona E, Navazo A, Martinez-Granero F, Capdevila S, Rivilla R & Martin M (2008) Transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology* **190**: 4106-4109.
- Redondo-Nieto M**, Barret M, Morrissey J, *et al.* (2013) Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC genomics* **14**: 54.
- Reinhold-Hurek B & Hurek T** (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in plant biology* **14**: 435-443.
- Rico-Jimenez M**, Munoz-Martinez F, Krell T, Gavira JA & Pineda-Molina E (2013) Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the ligand-binding regions of the PctA and PctB chemoreceptors from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with amino acids. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications* **69**: 1431-1435.
- Rich JJ**, Kinscherf TG, Kitten T & Willis DK (1994) Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology* **176**: 7468-7475.
- Rodriguez-Herva JJ**, Duque E, Molina-Henares MA, *et al.* (2010) Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology reports* **2**: 373-380.
- Roelofs KG**, Jones CJ, Helman SR, Shang X, Orr MW, Goodson JR, Galperin MY, Yildiz FH & Lee VT (2015) Systematic Identification of Cyclic-di-GMP Binding Proteins in *Vibrio cholerae* Reveals a Novel Class of Cyclic-di-GMP-Binding ATPases Associated with Type II Secretion Systems. *PLoS pathogens* **11**: e1005232.
- Römling U**, Galperin MY & Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* **77**: 1-52.
- Ross P**, Weinhouse H, Aloni Y, *et al.* (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279-281.
- Rudrappa T**, Czymmek KJ, Pare PW & Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology* **148**: 1547-1556.
- Ryan RP**, Fouhy Y, Lucey JF, *et al.* (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 6712-6717.
- Ryan RP** (2013) Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiology* **159**: 1286-1297.
- Ryjenkov DA**, Simm R, Romling U & Gomelsky M (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of biological chemistry* **281**: 30310-30314.
- Ryu RJ & Patten CL** (2008) Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of bacteriology* **190**: 7200-7208.
- Sadowski P** (1986) Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *Journal of bacteriology* **165**: 341-347.
- Sampedro I**, Parales RE, Krell T & Hill JE (2015) *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS microbiology reviews* **39**: 17-46.
- Sanchez-Contreras M**, Martin M, Villaceros M, O'Gara F, Bonilla I & Rivilla R (2002) Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of bacteriology* **184**: 1587-1596.
- Santiago CD**, Yagi S, Ijima M, Nashimoto T, Sawada M, Ikeda S, Asano K, Orikasa Y & Ohwada T (2017) Bacterial Compatibility in Combined Inoculations Enhances the Growth of Potato Seedlings. *Microbes and environments* **32**: 14-23.
- Sarenko O**, Klauck G, Wilke FM, Pfiffer V, Richter AM, Herbst S, Kaever V & Hengge R (2017) More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. *mBio* **8**.
- Sauer K**, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW & Davies DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology* **184**: 1140-1154.
- Saunders NJ**, Moxon ER & Gravenor MB (2003) Mutation rates: estimating phase variation rates when fitness differences are present and their impact on population structure. *Microbiology* **149**: 485-495.

- Schenk A**, Weingart H & Ullrich MS (2008) The alternative sigma factor AlgT, but not alginate synthesis, promotes in planta multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea. *Microbiology* **154**: 413-421.
- Scher FM**, Kloepper JW, Singleton C, Zaleski I & Laliberte M (1988) Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: relationship to bacterial motility, chemotaxis and generation time. *Phytopathology*. **78**: 1055-1059.
- Schirmer T & Jenal U** (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature reviews Microbiology* **7**: 724-735.
- Schlesinger WH** (2009) On the fate of anthropogenic nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 203-208.
- Schmidt-Eisenlohr H**, Gast A & Baron C (2003) Inactivation of *gacS* does not affect the competitiveness of *Pseudomonas chlororaphis* in the *Arabidopsis thaliana* rhizosphere. *Applied and environmental microbiology* **69**: 1817-1826.
- Schmidt J**, Musken M, Becker T, Magnowska Z, Bertinetti D, Moller S, Zimmermann B, Herberg FW, Jansch L & Haussler S (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxis methyltransferase CheR1 impacts on bacterial surface sampling. *PloS one* **6**: e18184.
- Schubert M**, Lapouge K, Duss O, Oberstrass FC, Jelesarov I, Haas D & Allain FH (2007) Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nature structural & molecular biology* **14**: 807-813.
- Schulz S & Dickschat JS** (2007) Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural product reports* **24**: 814-842.
- Schulz T**, Rydzewski K, Schunder E, Holland G, Bannert N & Heuner K (2012) FlhA expression analysis and influence of the regulatory proteins RpoN, FleQ and FlhA on virulence and in vivo fitness in *Legionella pneumophila*. *Archives of microbiology* **194**: 977-989.
- Seshasayee AS**, Bertone P, Fraser GM & Luscombe NM (2006) Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Current opinion in microbiology* **9**: 511-519.
- Shanahan P**, O'Sullivan D J, Simpson P, Glennon JD & O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and environmental microbiology* **58**: 353-358.
- Shimizu R**, Taguchi F, Marutani M, Mukaiharu T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T & Ichinose Y (2003) The *DeltaflhD* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. *Molecular genetics and genomics : MGG* **269**: 21-30.
- Shitashiro M**, Tanaka H, Hong CS, Kuroda A, Takiguchi N, Ohtake H & Kato J (2005) Identification of chemosensory proteins for trichloroethylene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bioscience and bioengineering* **99**: 396-402.
- Simons M**, van der Bij AJ, Brand I, de Weger LA, Wijffelman CA & Lugtenberg BJ (1996) Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **9**: 600-607.
- Skotnicka D**, Smaldone GT, Petters T, Trampari E, Liang J, Kaeffer V, Malone JG, Singer M & Sogaard-Andersen L (2016) A Minimal Threshold of c-di-GMP Is Essential for Fruiting Body Formation and Sporulation in *Myxococcus xanthus*. *PLoS genetics* **12**: e1006080.
- Sly LM**, Worobec EA, Perkins RE & Phibbs PV, Jr. (1993) Reconstitution of glucose uptake and chemotaxis in *Pseudomonas aeruginosa* glucose transport defective mutants. *Canadian journal of microbiology* **39**: 1079-1083.
- Sourjik V & Berg HC** (2002) Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 123-127.
- Sourjik V**, Vaknin A, Shimizu TS & Berg HC (2007) In vivo measurement by FRET of pathway activity in bacterial chemotaxis. *Methods in enzymology* **423**: 365-391.
- Sourjik V & Wingreen NS** (2012) Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Current opinion in cell biology* **24**: 262-268.
- Steiner S**, Lori C, Boehm A & Jenal U (2013) Allosteric activation of exopolysaccharide synthesis through cyclic di-GMP-stimulated protein-protein interaction. *The EMBO journal* **32**: 354-368.
- Stockwell VO**, Johnson KB, Sugar D & Loper JE (2010) Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1 applied as single strains and mixed inocula. *Phytopathology* **100**: 1330-1339.
- Succurro A**, Moejes FW & Ebenhoh O (2017) A Diverse Community To Study Communities: Integration of Experiments and Mathematical Models To Study Microbial Consortia. *Journal of bacteriology* **199**.

- Sudarsan N**, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, Link KH & Breaker RR (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-413.
- Sundriyal A**, Massa C, Samoray D, Zehender F, Sharpe T, Jenal U & Schirmer T (2014) Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *The Journal of biological chemistry* **289**: 6978-6990.
- Suwa M**, Sugino H, Sasaoka A, Mori E, Fujii S, Shinkawa H, Nimi O & Kinashi H (2000) Identification of two polyketide synthase gene clusters on the linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei*. *Gene* **246**: 123-131.
- Taguchi K**, Fukutomi H, Kuroda A, Kato J & Ohtake H (1997) Genetic identification of chemotactic transducers for amino acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **143** (Pt 10): 3223-3229.
- Tal R**, Wong HC, Calhoun R, *et al.* (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of bacteriology* **180**: 4416-4425.
- Tallawi M**, Opitz M & Lieleg O (2017) Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges. *Biomaterials science* **5**: 887-900.
- Tart AH**, Wolfgang MC & Wozniak DJ (2005) The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ. *Journal of bacteriology* **187**: 7955-7962.
- Tart AH**, Blanks MJ & Wozniak DJ (2006) The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Journal of bacteriology* **188**: 6483-6489.
- Teintze M**, Hossain MB, Barnes CL, Leong J & van der Helm D (1981) Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* **20**: 6446-6457.
- Tennant SM**, Skinner NA, Joe A & Robins-Browne RM (2005) Homologues of insecticidal toxin complex genes in *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and their contribution to virulence. *Infection and immunity* **73**: 6860-6867.
- Thompson JN & Cunningham BM** (2002) Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature* **417**: 735-738.
- Thormann KM & Paulick A** (2010) Tuning the flagellar motor. *Microbiology* **156**: 1275-1283.
- Trampari E**, Stevenson CE, Little RH, Wilhelm T, Lawson DM & Malone JG (2015) Bacterial rotary export ATPases are allosterically regulated by the nucleotide second messenger cyclic-di-GMP. *The Journal of biological chemistry* **290**: 24470-24483.
- Tschowri N**, Schumacher MA, Schlimpert S, Chinnam NB, Findlay KC, Brennan RG & Buttner MJ (2014) Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development. *Cell* **158**: 1136-1147.
- Valentini M & Filloux A** (2016) Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *The Journal of biological chemistry* **291**: 12547-12555.
- Valentini M**, Gonzalez D, Mavridou DA & Filloux A (2017) Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current opinion in microbiology* **41**: 15-20.
- van den Broek D**, Chin AWTF, Eijkemans K, Mulders IH, Bloemberg GV & Lugtenberg BJ (2003) Biocontrol traits of *Pseudomonas spp.* are regulated by phase variation. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **16**: 1003-1012.
- van den Broek D**, Bloemberg GV & Lugtenberg B (2005a) The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environmental microbiology* **7**: 1686-1697.
- van den Broek D**, Chin AWTF, Bloemberg GV & Lugtenberg BJ (2005b) Molecular nature of spontaneous modifications in *gacS* which cause colony phase variation in *Pseudomonas sp.* strain PCL1171. *Journal of bacteriology* **187**: 593-600.
- van der Heijden MG**, Bardgett RD & van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters* **11**: 296-310.
- van der Voort M**, Kempenaar M, van Driel M, Raaijmakers JM & Mendes R (2016) Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. *Ecology letters* **19**: 375-382.
- van der Woude MW & Baumber AJ** (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clinical microbiology reviews* **17**: 581-611, table of contents.
- van Elsas JD**, Chiurazzi M, Mallon CA, Elhottova D, Kristufek V & Salles JF (2012) Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 1159-1164.

- Van Loon L.** (2007) Plant responses to plant growth-promoting bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**: 243-254.
- Van Luijk A** (1938) Antagonism between various microorganisms and different species of the genus *Pythium*, parasitizing upon grasses and lucerne. *Mededelingen van het Phytopathologisch Laboratorium "Willie Commelin Scholten"- Baarn*, **14**: 43-83.
- Vander Wauven C**, Pierard A, Kley-Raymann M & Haas D (1984) *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *Journal of bacteriology* **160**: 928-934.
- Vejan P**, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S & Nasrulhaq Boyce A (2016) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability-A Review. *Molecules* **21**.
- Verbon EH & Liberman LM** (2016) Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. *Trends in plant science* **21**: 218-229.
- Vesper SJ** (1987) Production of Pili (Fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and Correlation with Attachment to Corn Roots. *Applied and environmental microbiology* **53**: 1397-1405.
- Villacieros M**, Power B, Sánchez-Contreras M, Lloret J, Oruezabal R, Martín M, Fernández-Piñas F, Bonilla C, Dowling DN & Rivilla R (2003) Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere. *Plant Soil.* **251**: 47-54.
- Villacieros M**, Whelan C, Mackova M, et al. (2005) Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *Pseudomonas fluorescens* F113 derivatives, using a *Sinorhizobium meliloti* nod system to drive *bph* gene expression. *Applied and environmental microbiology* **71**: 2687-2694.
- Wadhams GH & Armitage JP** (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 1024-1037.
- Walker BJ**, Stan GV & Polizzi KM (2017) Intracellular delivery of biologic therapeutics by bacterial secretion systems. *Expert reviews in molecular medicine* **19**: e6.
- Wasi S**, Tabrez S & Ahmad M (2013) Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environmental monitoring and assessment* **185**: 8147-8155.
- Wassmann P**, Chan C, Paul R, Beck A, Heerklotz H, Jenal U & Schirmer T (2007) Structure of BeF3⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* **15**: 915-927.
- Wei HL & Collmer A** (2017) Defining essential processes in plant pathogenesis with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 disabled polymutants and a subset of key type III effectors. *Molecular plant pathology*.
- Weller DM**, Raaijmakers JM, Gardener BB & Thomashow LS (2002) Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual review of phytopathology* **40**: 309-348.
- Weller DM** (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* **97**: 250-256.
- Whitchurch CB**, Leech AJ, Young MD, et al. (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **52**: 873-893.
- Whitehead NA**, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ & Salmond GP (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews* **25**: 365-404.
- Whitney JC**, Whitfield GB, Marmont LS, Yip P, Neculai AM, Lobsanov YD, Robinson H, Ohman DE & Howell PL (2015) Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of biological chemistry* **290**: 12451-12462.
- Winkler A**, Udvarhelyi A, Hartmann E, Reinstein J, Menzel A, Shoeman RL & Schlichting I (2014) Characterization of elements involved in allosteric light regulation of phosphodiesterase activity by comparison of different functional BlrP1 states. *Journal of molecular biology* **426**: 853-868.
- Witzig R**, Aly HA, Strompl C, Wray V, Junca H & Pieper DH (2007) Molecular detection and diversity of novel diterpenoid dioxygenase Dita1 genes from proteobacterial strains and soil samples. *Environmental microbiology* **9**: 1202-1218.
- Wozniak DJ**, Sprinkle AB & Baynham PJ (2003) Control of *Pseudomonas aeruginosa* *algZ* expression by the alternative sigma factor AlgT. *Journal of bacteriology* **185**: 7297-7300.
- Wuichet K & Zhulin IB** (2010) Origins and diversification of a complex signal transduction system in prokaryotes. *Science signaling* **3**: ra50.
- Yang F**, Tian F, Li X, Fan S, Chen H, Wu M, Yang CH & He C (2014) The degenerate EAL-GGDEF domain protein Filp functions as a cyclic di-GMP receptor and specifically interacts with the PilZ-domain protein

PXO_02715 to regulate virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* **27**: 578-589.

Yang MM, Mavrodi DV, Mavrodi OV, Bonsall RF, Parejko JA, Paulitz TC, Thomashow LS, Yang HT, Weller DM & Guo JH (2011) Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields. *Phytopathology* **101**: 1481-1491.

Yao J & Allen C (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of bacteriology* **188**: 3697-3708.

Young GM, Schmiel DH & Miller VL (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6456-6461.

Yousef-Coronado F, Travieso ML & Espinosa-Urgel M (2008) Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology letters* **288**: 118-124.

Zamioudis C, Mastranesti P, Dhonukshe P, Blilou I & Pieterse CM (2013) Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant physiology* **162**: 304-318.

Zhang CJ, Delgado-Baquerizo M, Drake JE, Reich PB, Tjoelker MG, Tissue DT, Wang JT, He JZ & Singh BK (2018) Intraspecies variation in a widely distributed tree species regulates the responses of soil microbiome to different temperature regimes. *Environmental microbiology reports*.

Zhou H, Zheng C, Su J, Chen B, Fu Y, Xie Y, Tang Q, Chou SH & He J (2016) Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter. *Scientific reports* **6**: 20871.

Objetivos

El movimiento dependiente de flagelo es uno de los caracteres más importantes durante la colonización de la rizosfera. El objetivo global de este trabajo es analizar la regulación de la movilidad de *P. fluorescens* F113 en respuesta a las condiciones ambientales, que incluye el papel del regulador transcripcional AmrZ, el segundo mensajero c-di-GMP y los sistemas de quimiotaxis.

1. Analizar el papel de AmrZ en la regulación de los niveles citoplasmáticos del segundo mensajero c-di-GMP.
2. Conocer la implicación del c-di-GMP en la biosíntesis del aparato flagelar
3. Determinar la funcionalidad de los tres sistemas quimiotácticos de *P. fluorescens* F113 y estudiar su expresión en condiciones limitantes de oxígeno.

Las aproximaciones experimentales llevadas a cabo para la realización de estos objetivos, así como los resultados obtenidos se detallan en los capítulos 2,3 y 4 de esta memoria.

Capítulo 2

AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113

Candela Muriel, Eva Arrebola, Miguel Redondo-Nieto, Francisco Martínez-Granero, Blanca Jalvo, Sebastian Pfeilmeier, Esther Blanco-Romero, Irene Baena, Jacob G. Malone, Rafael Rivilla & Marta Martín. (2018). *Scientific reports* **8**: 1979.

Summary

The transcriptional regulator AmrZ is a global regulatory protein conserved within the pseudomonads. AmrZ can act both as a positive and a negative regulator of gene expression, controlling many genes implicated in environmental adaption. Regulated traits include motility, iron homeostasis, exopolysaccharides production and the ability to form biofilms. In *Pseudomonas fluorescens* F113, an *amrZ* mutant presents a pleiotropic phenotype, showing increased swimming motility, decreased biofilm formation and very limited ability for competitive colonization of rhizosphere, its natural habitat. It also shows different colony morphology and binding of the dye Congo Red. The *amrZ* mutant presents severely reduced levels of the messenger molecule cyclic-di-GMP (c-di-GMP), which is consistent with the motility and biofilm formation phenotypes. Most of the genes encoding proteins with diguanylate cyclase (DGCs) or phosphodiesterase (PDEs) domains, implicated in c-di-GMP turnover in this bacterium, appear to be regulated by AmrZ. Phenotypic analysis of eight mutants in genes shown to be directly regulated by AmrZ and encoding c-di-GMP related enzymes, showed that seven of them were altered in motility and/or biofilm formation. The results presented here show that in *P. fluorescens*, AmrZ determines c-di-GMP levels through the regulation of a complex network of genes encoding DGCs and PDEs.

Introduction

AmrZ is a highly conserved transcriptional regulator within the pseudomonads (Martinez-Granero *et al.*, 2014). It was originally identified as a transcriptional activator of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa* and named AlgZ (Baynham & Wozniak, 1996). It was later shown to regulate also twitching motility and the name was changed to AmrZ (alginate and motility regulator) (Baynham *et al.*, 2006). Its implication in regulation of motility was extended by the finding of AmrZ as a repressor of flagellar synthesis in cystic fibrosis mucoid isolates of *P. aeruginosa*. This repression is exerted through transcriptional repression of the master regulator of flagella synthesis *fleQ* (Tart *et al.*, 2006). Regulation of flagella synthesis by AmrZ through repression of *fleQ* was also observed in the plant-associated soil microbe *P. fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2012). AmrZ acts therefore as an activator and a repressor of the transcription of different genes. ChIP-Seq analysis both in *P. aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014) and *P. fluorescens* (Martinez-Granero *et al.*, 2014b) has shown that AmrZ binds to hundreds of regions in both genomes and has been considered therefore to be a global regulator. Many of the AmrZ regulated genes are implicated in environmental adaption, and besides motility and alginate production, AmrZ regulates, among others, genes implicated in iron homeostasis, virulence, signal transduction and c-di-GMP production both in *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* (Martinez-Granero *et al.*, 2012, Martinez-Granero *et al.*, 2014b, Allsopp *et al.*, 2017). AmrZ has also been shown to transcriptionally repress cellulose production, which is c-di-GMP stimulated, in *P. syringae* (Prada-Ramirez *et al.*, 2016).

c-di-GMP is a messenger molecule implicated in bacterial adaption and defines bacterial life-styles. In this sense, the cytoplasmic levels of c-di-GMP are involved in the transition from sessile to planktonic life-style and, in the case of pathogens from acute to chronic infection (Tamayo *et al.*, 2007). c-di-GMP levels are maintained by the opposing activity of diguanylate cyclases and phosphodiesterases (Simm *et al.*, 2004). The former are proteins with GGDEF domains while the later are proteins containing EAL or HD-GYP domains (Ausmees *et al.*, 2001, Tischler & Camilli, 2004, Fouhy *et al.*, 2006). GGDEF and EAL domains are often present in the same protein (Guvener & McCarter, 2003). In these cases, proteins can either be bi-functional (Phippen *et al.*, 2014) or only one of the domains possesses catalytic activity (Wei *et al.*, 2016). Other proteins implicated in c-di-GMP related

functions contain sensor or receptor domains, such as the PilZ domain (Amikam & Galperin, 2005), among others. We have previously shown by ChIP-Seq that in *P. fluorescens* F113, fourteen genes encoding proteins that contain GGDEF, EAL or HD-GYP domains are predicted to be targets of AmrZ (Martinez-Granero *et al.*, 2014b).

The aim of this work was to investigate the role of AmrZ in the regulation of the cytoplasmic levels of c-di-GMP in *P. fluorescens* F113 and the impact on adaptive traits such as motility and biofilm formation. We have used a combination of RNA-Seq and the phenotypic analysis of mutants affected in AmrZ and in c-di-GMP related genes, confirmed to be regulated by this global transcriptional regulator.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and mutant construction.

Pseudomonas fluorescens F113 and derivatives were routinely grown in SA medium (Scher & Baker, 1982) at 28°C. Purified agar (1.5% w/v) was used for solid medium and antibiotics were used for selection as required (rifampicin (Rif), 100 µg/mL; tetracycline (Tet), 70 µg/mL; kanamycin (Km), 50 µg/mL; cycloheximide (Ch), 10 µg/mL, gentamicin (Gm), 3 µg/mL and piperacillin (Pip) 30µg/mL). To induce expression of vector promoters, Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.25 mM was used. *E. coli* DH5α was used for DNA manipulation and was grown at 37°C in LB medium supplemented with bacteriological agar (1.5% w/v) and/or antibiotics when required (ampicillin (Amp), 100 µg/mL; tetracycline (Tet), 10 µg/mL; kanamycin (Km), 25 µg/mL; gentamicin (Gm), 10 µg/mL; piperacillin (Pip) 30µg/mL and chloramphenicol 30 µg/mL).

Mutants were constructed by homologous recombination of internal fragments of the targeted gene, cloned into the suicide vectors pK18*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) or pG18*mob2* (Kirchner & Tauch, 2003). The constructs were introduced into F113 by triparental mating and selected for homologous recombination. Mutant construction is detailed in Supplementary Table 2.1. All mutants were checked by PCR and Southern blotting. Complementation of mutants was performed by expressing a wild-type copy of the

gene in expression vectors pVLT31 (de Lorenzo *et al.*, 1993) or pBBRMCS5 (Kovach *et al.*, 1995) (Supplementary Table 1).

Phenotypic analysis of mutants.

Swimming motility was determined in SA plates supplemented with 0.3% of purified agar as described before (Navazo *et al.*, 2009). Swimming halo diameters were determined after 24h incubation at 28°C. Experiments were performed in triplicate, with three replicas in each experiment.

To examine biofilm formation a modified version of a previously described quantification method of Peeters *et al.* was used (Peeters *et al.*, 2008). Briefly, overnight cultures grown in LB medium were adjusted to OD₆₀₀ at 0.8 into a fresh LB and incubated at 28°C for 2 hours in 96-well-microlitre plates. After staining and washing, absorbance of the eluted crystal violet was measured at OD₅₉₀ on a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Wilusky, VT, USA). Experiments were repeated three times with 16 technical replicas in each assay.

Competitive rhizosphere colonization analysis was performed essentially as described in (Little *et al.*, 2016) using alfalfa (*Medicago sativa* var. Resis) seedlings. *P. fluorescens* Km^R was used as a control (Capdevila *et al.*, 2004). Control and tester strains were co-inoculated at 1x10³ colony-forming units (CFUs) to one-week-old seedlings. After a further week, rhizosphere bacteria were recovered by vortexing and dilutions plated on SA agar with Rif and Clh. CFU of each strain were distinguished and counted by growth with and without antibiotic. Experiments were performed in triplicate and each experiment contained eight independent plants.

Congo Red binding and colony morphology was determined on King's B plates (King *et al.*, 1954) supplemented with 0.004% Congo Red. 10 µL drops of an overnight culture were spotted on plates and incubated at 28°C for 48h before inspection.

c-di-GMP determinations.

Fluorescence intensity emitted by F113 and *amrZ* strains harbouring the pCdrA::*gfp^C* biosensor vector (Rybtke *et al.*, 2012) was visualized with a Leica M165 FC stereomicroscope using a GFP filter set (Excitation/Emission 494/518 nm) with different exposure times. Pictures were taken with the Leica Application Suite software, with exposure time elapsed to 50 milliseconds.

Indirect quantitative detection of c-di-GMP intracellular concentration was measured by microplate-based assays of the wt and *amrZ* strains harbouring pCdrA::*gfp^C* vector. Overnight cultures grown in LB were diluted to OD₆₀₀ at 0.5 and fluorescence (excited at 485/20, emission at 528/20 nm) was measured in a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Wilusky, VT, USA) using 96 black-well plates. The experiments were conducted in triplicate with 16 technical replicas in each experiment.

Extraction and quantification of c-di-GMP was performed as described in (Pfeilmeier *et al.*, 2016). Extraction was performed from 50 mL of LB cultures grown to OD₆₀₀ of 0.6. Pellets were used for protein determination by A₂₈₀ in a NanoDrop spectrophotometer, after solubilization in 200 µL of 0.1M NaOH and heating at 95°C for 15 minutes. Nucleotide extracts were subjected to LC-MS as described (Pfeilmeier *et al.*, 2016) and c-di-GMP was quantified by using an external standard calibration curve. Five extracts were analyzed for each strain.

Statistical analysis

For all the tested phenotypes, results were statistically analyzed using GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad software, La Jolla, California, USA). Data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's correction of multiple comparison test ($p \leq 0.0001$) or unpaired t test two-tailed ($p \leq 0.0001$).

RNA extraction and RNA-Seq analysis.

RNA was extracted from cultures grown in SA medium to exponential (OD₆₀₀ 0.6) and stationary phase (OD₆₀₀ 1.2). Three independent cultures per strain and condition were mixed prior to RNA extraction. RNA isolation was performed using TRIzol™ (Invitrogen)-chloroform followed by an isopropanol precipitation. The obtained RNA was treated with DNase (RQ1, Promega) and finally was purified using the RNeasy and Concentrator™-5 column (Zymo Research). rRNA depletion, library construction and sequencing was custom performed by Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia). Two libraries per sample were prepared and sequencing was carried out using Illumina MiSeq paired end, 2x100 bp.

Illumina reads were clipped and trimmed to remove low quality nucleotides as well as putative Illumina adapters by using Trimmomatic v 0.35 (Lohse *et al.*, 2012), specifying a sliding window of 4 nts with an average phred quality of 20 and 50 nts as minimum read length to be conserved. Filtered paired reads were aligned to reference genome *P. fluorescens* F113 (GenBank: NC_016830) with Bowtie v2 (Langmead & Salzberg, 2012). Alignment SAM files were sorted and converted to BAM using SAMtools (Li *et al.*, 2009) and gene counts were determined by HTSeq (Anders *et al.*, 2015). HTSeq-count tables were used to calculate expression levels for each gene using FPKM formula (Mortazavi *et al.*, 2008) and statistical significance using DESeq 2 R package (Love *et al.*, 2014). Relative expression values were calculated as follows $\log_2(\text{FPKM}^{\text{AmrZ}}) - \log_2(\text{FPKM}^{\text{F113}})$. *P. fluorescens* F113 genes annotated as encoding diguanylate cyclases and phosphodiesterases were selected to prepare the heatmap expression figure with pheatmap R package.

Data availability

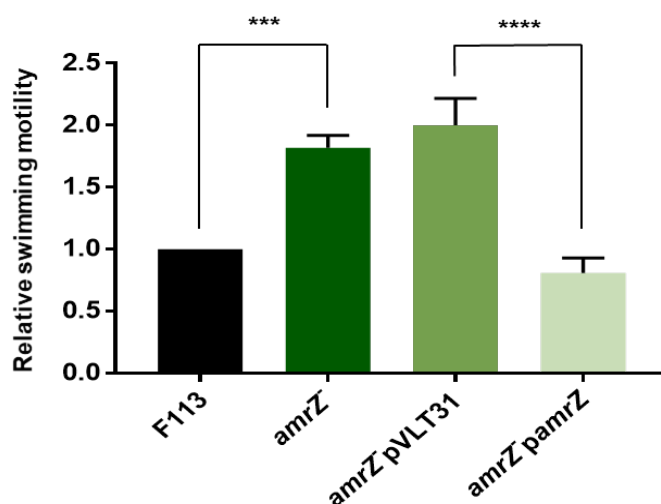
RNA-Seq raw data have been deposited at NCBI as Bioproject PRJNA419480.

Results

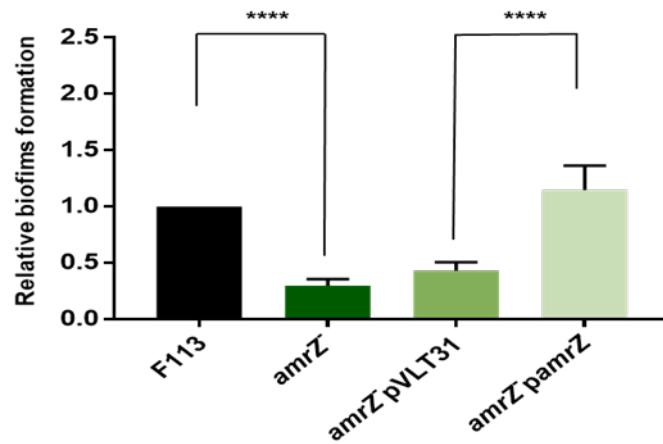
AmrZ affects motility, biofilm formation and competitive rhizosphere colonization.

We have previously shown that AmrZ affects motility since an *amrZ* mutant is hypermotile due to enhanced production of flagellar components (Martinez-Granero *et al*, 2014b, Tart *et al.*, 2006). As shown in Figure 2.1A, ectopic expression of a wild-type (wt) copy of the *amrZ* gene restores wild-type motility to the mutant strain. When grown in King's B liquid medium under shaking conditions, the *amrZ* mutant does not form a pellicle on the tube surface compared to the pellicle produced by the wild-type strain F113 (Supplementary Fig.2.1) suggesting a defect in biofilm formation. For this reason, we performed an assay to determine attachment to plastic microtiter plates. As shown in Figure 2.1B, attachment to plastic in microtiter plates is severely reduced in the *amrZ* mutant when compared with the wt. Complementation of the mutant with a plasmid expressing *amrZ* from a constitutive promoter restored attachment to the wild-type levels. Taken together, these results show that AmrZ is required for formation of wild-type biofilm levels. We have previously shown that hypermotile F113 mutants have increased ability for competitive rhizosphere colonization, even when they are defective for biofilm formation (Barahona *et al.*, 2010). However, when rhizosphere colonization analyses were performed to compare the *amrZ* mutant with the wild-type strain (Fig. 2.1C), the *amrZ* mutant was severely impaired in rhizosphere competitive colonization, indicating that the function of AmrZ is required for fitness in the rhizosphere environment.

A



B



C

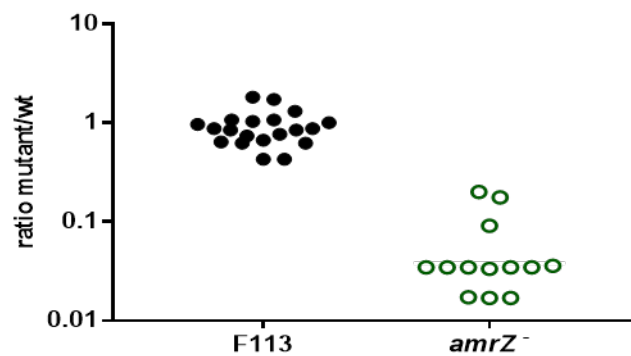


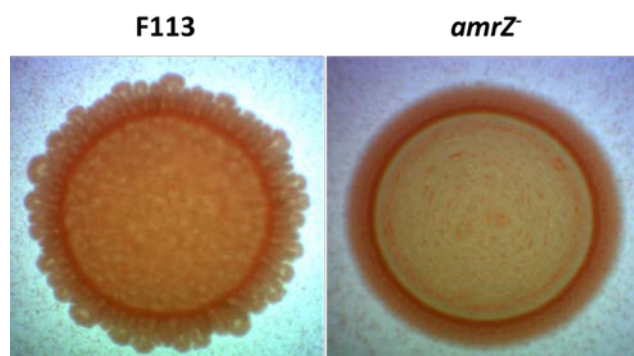
Figure 2.1: AmrZ affects motility, biofilm formation and competitive rhizosphere colonization.

(A) Swimming motility phenotypes of *P. fluorescens* F113, its *amrZ* mutant and complementation analysis of the mutant. 24h haloes on SA with 0.3 agar were measured and referred to the control strains. Averages and standard deviation of three biological replicas with three technical replications are presented. **(B)** Biofilm formation (attachment) phenotypes of *P. fluorescens* F113, its *amrZ* mutant and complementation analysis of the mutant. Crystal violet staining the biomass attached to the walls of microtiter plates after 2h of incubation was determined at OD₅₉₀ and referred to the control strains. Averages and standard deviations of three biological replicates with sixteen technical replications are presented. **(C)** Competitive rhizosphere colonization of *P. fluorescens* F113 and its *amrZ* mutant. Bacterial colonies recovered from the rhizosphere after one-week inoculation were tested for antibiotic resistance to distinguish the control and the tester strains and counted. Percentages of tester colonies referred to total colonies are represented in a logarithmic scale. Each experiment was repeated three times, with eight plants per experiment. Each dot represents results from a single plant. Asterisks represent statistical significance of the data: *** p<0.001; **** p<0.0001.

AmrZ regulates exopolysaccharide production and c-di-GMP levels.

Motility and biofilm formation are inversely regulated by the messenger molecule c-di-GMP. This molecule also regulates exopolysaccharides production. To test whether AmrZ affects exopolysaccharide production, the *amrZ* mutant and the wt strain were grown in King's B medium in the presence of Congo Red, a dye that binds to several exopolysaccharides and has been used as an indirect measurement of c-di-GMP production. As shown in Figure 2.2A, the two strains showed a different colouring pattern and colony morphology in the presence of Congo Red, indicating different exopolysaccharide(s) production. To test the cytoplasmic concentration of c-di-GMP, two methods were used. First, introduction of the *gfp* based pCdrA biosensor (Rybtke *et al.*, 2012) in the wt strain and the *amrZ* mutant revealed that c-di-GMP concentration was higher in the wt strain (Fig. 2.2B). Quantification of fluorescence (Fig. 2.2C) confirmed that the wild-type strain contained about five times more c-di-GMP than the *amrZ* mutant. These results were validated by determination of c-di-GMP concentration in both strains through LC-MS (Fig. 2.2D), showing that c-di-GMP concentration in the wt was 6.4 pmol/mg protein compared to the 1.5 pmol/mg protein measured in the *amrZ* mutant. These results show that c-di-GMP concentration is 4.2 times higher in the wt, indicating that AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *P. fluorescens* F113.

A



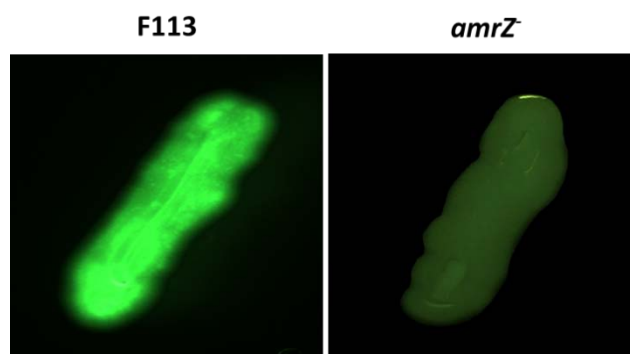
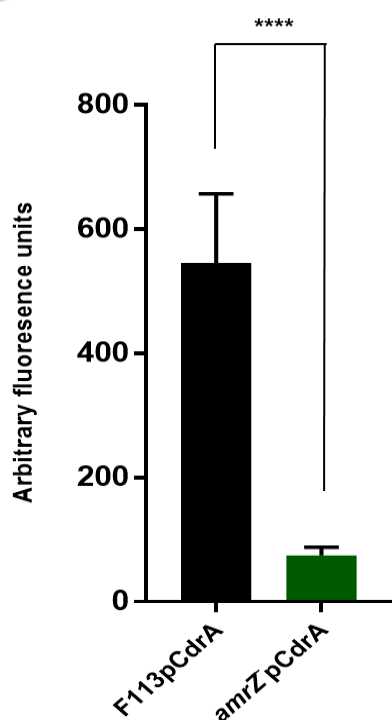
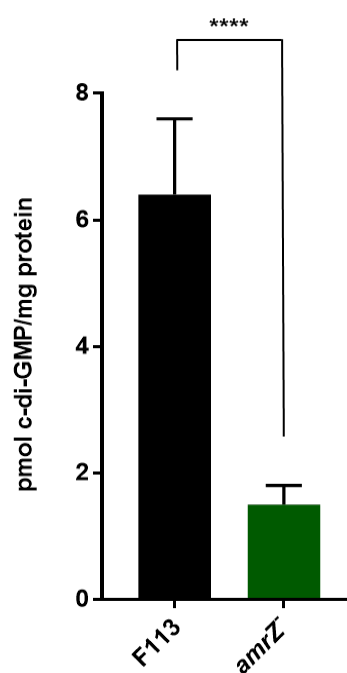
B**C****D**

Figure 2.2: AmrZ regulates exopolysaccharide production and c-di-GMP levels. (A) Morphology of colonies of *P. fluorescens* F113 and its *amrZ* mutant after 48h growth in King's B medium in the presence of Congo Red. **(B)** Streaks on LB medium of *P. fluorescens* F113 and its *amrZ* mutant harboring a plasmid with the *gfp* based pCdrA biosensor for c-di-GMP. Pictures were taken with a Leika binocular microscope, using a GFP filter set. Exposition time was 50 milliseconds. **(C)** Quantification of fluorescence emitted by *P. fluorescens* F113pCdrA and its *amrZ* mutant harboring pCdrA. Averages and standard deviations of three independent experiments with sixteen technical replicas each are presented. **(D)** c-di-GMP quantification by LC-MS in *P. fluorescens* F113 and its *amrZ* mutant. Averages and standard deviation of five analyzed extracts per strain are presented. Asterisks represent statistical significance of the data: ****p<0.0001.

AmrZ transcriptionally regulates a large number of genes implicated in c-di-GMP turnover.

We have previously shown that AmrZ binds to the promoter region of 14 genes implicated in c-di-GMP turnover (Martinez-Granero *et al.*, 2014b) (Table 2.1), which are therefore strong candidates to be directly regulated by AmrZ. We used an RNA-Seq approach to determine the influence of AmrZ in the expression of all the c-di-GMP turn-over related genes encoded in the F113 genome. Expression data showed the effects of AmrZ on the regulation of c-di-GMP genes. This regulation was especially evident during stationary phase, as shown in Figure.2.3. During this phase, the expression of most of the c-di-GMP genes is affected by the lack of the *amrZ* gene. Out of the affected genes, five were shown to be repressed by AmrZ, since they showed higher expression in the *amrZ* mutant than in the wild-type strain. Conversely, twenty-five c-di-GMP related genes were shown to be positively regulated by AmrZ, since their expression was lower in the *amrZ* mutant than in the wild-type. These results show that the expression of more than 65% of the c-di-GMP genes encoded in the F113 genome is affected by AmrZ, which acts mostly as a transcriptional activator for these genes. Furthermore, eight of the genes that were predicted as putative direct targets of AmrZ (Martinez-Granero *et al.*, 2014b), were indeed shown to be regulated by this protein ($p < 0.003$), seven of them positively and one of them negatively. Complete results for all the c-di-GMP genes (fold activation/repression, p and q values) are shown in Supplementary Table 2.1.

Locus	Name or homologue	c-di-GMP relates domains	Reference
PSF113_0499	<i>dipA</i> (PA5017)	GGDEF & EAL	(Roy <i>et al.</i> , 2012)
PSF113_0661	<i>gcbA</i> (Pfl01_0623)	GGDEF	(Newell <i>et al.</i> , 2011)
PSF113_0715	<i>yfiN</i> (PA1120)	GGDEF	(Malone <i>et al.</i> , 2010)
PSF113_1982	<i>adrA</i> (PFL_4532)	GGDEF	(Paulsen <i>et al.</i> , 2005)
PSF113_2333	<i>mucR</i> (PA1727)	GGDEF	(Hay <i>et al.</i> , 2009)
PSF113_3553	PA4108	HD-GYP	-
PSF113_4023	PFL_1902	GGDEF & EAL	(Paulsen <i>et al.</i> , 2005)
PSF113_4038	<i>gcbB</i> (Pfl01_1790)	GGDEF	(Newell <i>et al.</i> , 2011)
PSF113_4360	Pfl01_1678	GGDEF & EAL	(Newell <i>et al.</i> , 2011)
PSF113_4681	Pfl01_4551	GGDEF & EAL	(Newell <i>et al.</i> , 2011)
PSF113_4776	<i>gcbC</i> (Pfl01_4666)	GGDEF	(Newell <i>et al.</i> , 2011)
PSF113_4827	-	GGDEF	-
PSF113_5064	<i>morA</i> (PA4601)	GGDEF & EAL	(Choy <i>et al.</i> , 2004)
PSF113_5392	PFL_5686	GGDEF	(Paulsen <i>et al.</i> , 2005)

Table 2.1: c-di-GMP related genes identifies as putative AmrZ binding targets.

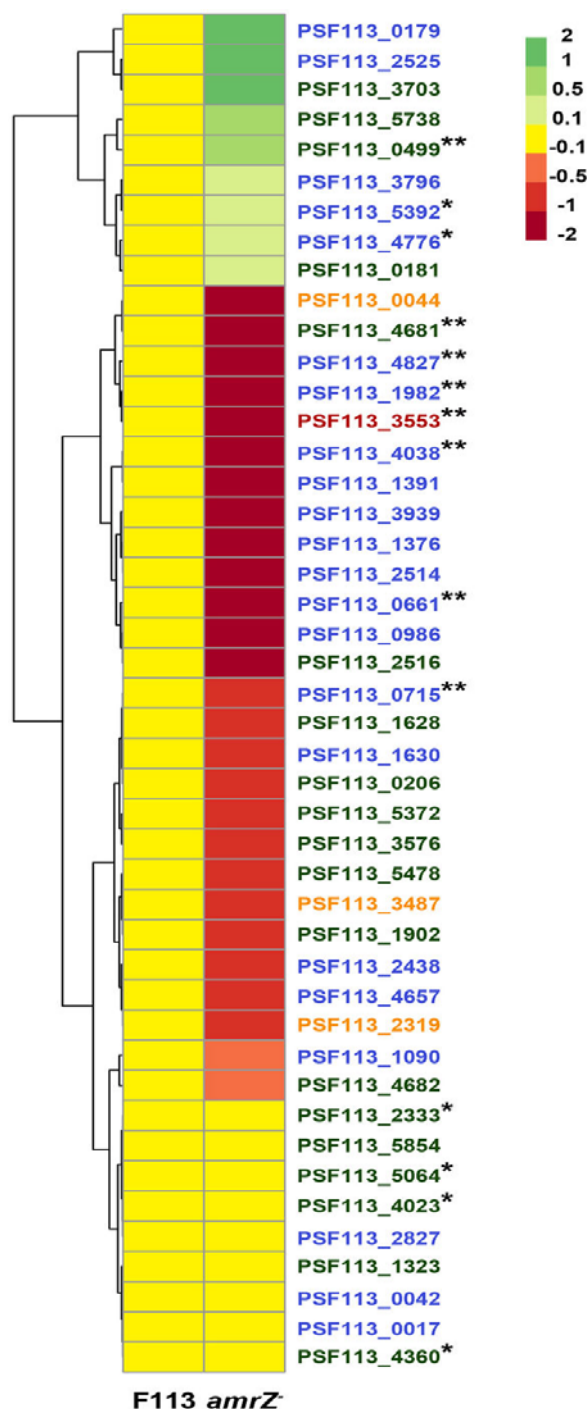


Figure 2.3: AmrZ transcriptionally regulates a large number of genes implicated in c-di-GMP turnover. Heatmap showing the differential expression of all the *P. fluorescens* F113 genes encoding enzymes involved in c-di-GMP turnover, in the wild-type strain and the *amrZ* mutant, in stationary phase. The heatmap was constructed based on FPKM values obtained by RNA-Seq data. The four different colors of the gene legends, depend on the protein domains: blue, GGDEF; orange, EAL; green, GGDEF and EAL; red, HD-GYP. The color scale represents the log base 2 of fold change of each gene relative to the wild-type: green, genes repressed by AmrZ, red-orange, genes upregulated by AmrZ; yellow, no AmrZ regulation. Log₂ fold change values and p and q values for each gene are provided in Supplementary Table 2.1. *, AmrZ binding site in gene promoter; **, AmrZ binding site in gene promoter and expression modified in *amrZ* mutant (p < 0.003).

Most of the c-di-GMP related genes directly regulated by AmrZ are involved in motility and/or biofilm formation.

In order to determine roles for the AmrZ-regulated c-di-GMP genes in motility and biofilm formation, we constructed mutants in the eight c-di-GMP genes that were predicted to be AmrZ binding-targets by ChIP-Seq(Martinez-Granero *et al.*, 2014b) and also showed regulation by AmrZ by RNA-Seq. All the mutants were tested for swimming motility (Fig. 2.4A) and biofilm formation (Fig. 2.4B). Seven out of the eight mutants showed a motility and/or biofilm formation phenotype compared to wt F113. The mutant affected in the PSF113_4038 gene (*gcbB*), did not show any significant phenotype. Only three of the mutants, those affected in genes PSF113_0499 (*dipA*), PSF113_0661 (*gcbA*) and PSF113_1982 (*adrA*) had a swimming motility phenotype, all of them showing increased motility. Six of the mutants had a significant biofilm formation phenotype: two of them increased biofilm formation and four of them showed a significant reduction in biofilm formation. Two of the mutants affected in motility, *dipA*⁻ and *adrA*⁻ were also affected in biofilm formation, showing increased motility and reduced biofilm formation phenotypes. The swimming motility phenotypes of *gcbA* and *adrA* mutants and the biofilm formation phenotype of the *adrA* mutant were complemented by expressing a wild-type copy of the respective gene under a constitutive promoter on a plasmid (Supplementary Fig. 2.2). However, we were unable to complement any of the phenotypes of the *dipA* mutant.

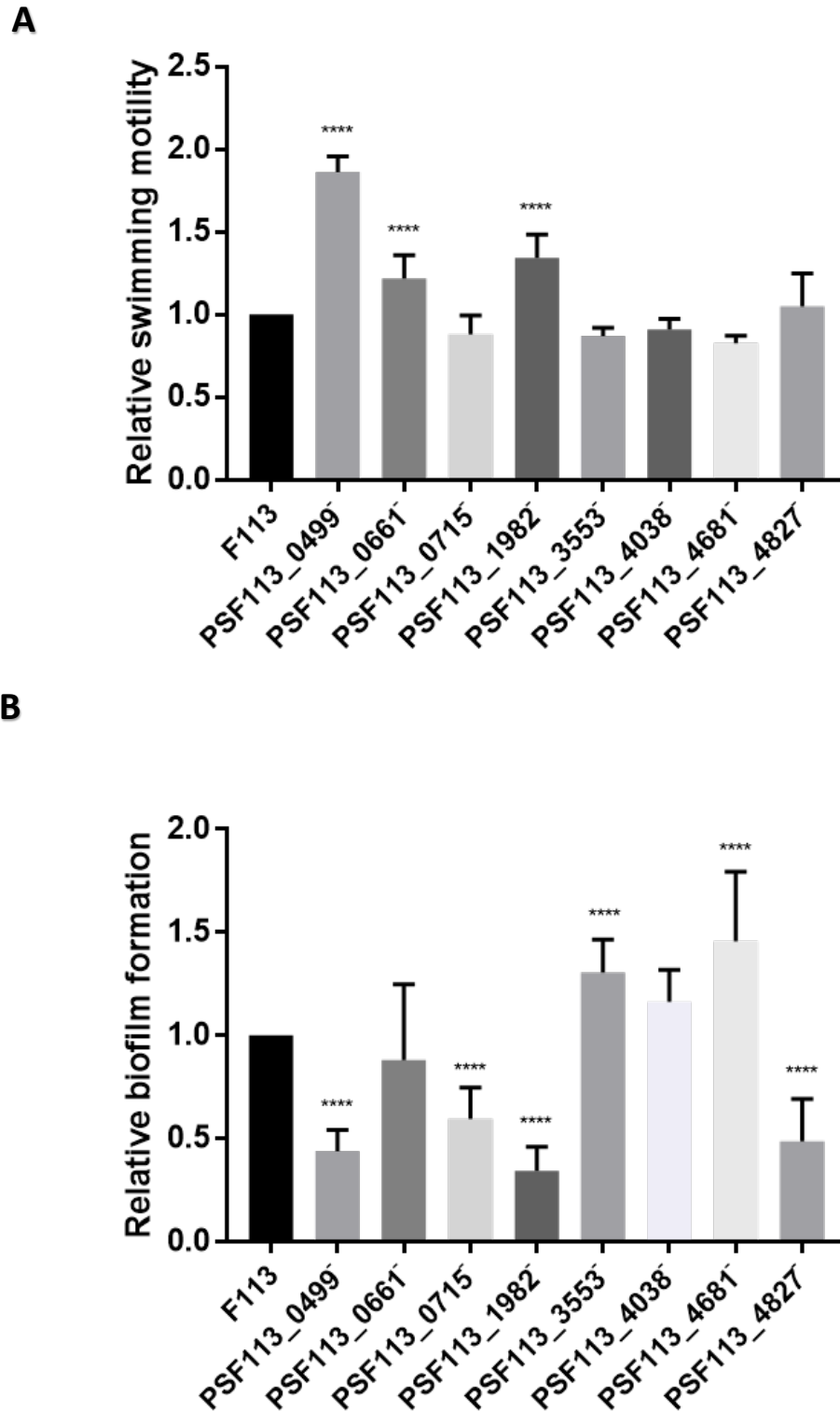


Figure 2.4: Most of the c-di-GMP related genes that are directly regulated by AmrZ are involved in motility and/or biofilm formation. (A) Relative swimming motility phenotype of *P. fluorescens* F113 and its eight mutants affected in the indicated gene (ORF number in www.pseudomonas.com) (Winsor et al., 2016). **(B)** Relative biofilm formation (attachment) phenotype of the same strains above. Experiments and replicas were performed as in Fig. 2.1. Asterisks represent statistical significance of the data: **** $p < 0.0001$.

Discussion

AmrZ has been shown to be a global regulator in *Pseudomonas fluorescens* (Martinez-Granero *et al.*, 2014) and *P. aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014). This global role leads to pleiotropic phenotypes of mutants lacking this regulator. As shown in Fig.2.1, the F113 *amrZ* mutant is affected in motility and biofilm formation, being hypermotile and defective in biofilm formation. Although the hypermotility phenotype is also present in the *P. aeruginosa* mutant, the biofilm formation phenotypes are opposed: defective in *P. fluorescens* and enhanced in *P. aeruginosa*. The hyperbiofilm formation in the *P. aeruginosa* mutant was originally attributed to the overproduction of the *psl* exopolysaccharide (Jones *et al.*, 2013), not produced by F113, but was later related also to c-di-GMP levels (Jones *et al.*, 2014). An interesting phenotype of the F113 *amrZ* mutant is its compromised ability to competitively colonize the rhizosphere. F113 hypermotile mutants described earlier were hypercompetitive for rhizosphere colonization (Martinez-Granero *et al.*, 2006), independently of their ability to form biofilms (Barahona *et al.*, 2010). In turn, the rhizosphere colonization phenotype of the hypermotile *amrZ* mutant is similar to those mutants that have lost motility (Capdevila *et al.*, 2004) or chemotaxis (Muriel *et al.*, 2015). These results indicate that factors besides motility and biofilm formation are affected in the *amrZ* mutant and that these factors are important for the fitness of *P. fluorescens* in the rhizosphere environment. It is interesting to note that the *P. aeruginosa amrZ* mutant is less virulent than the wild-type strain in a murine system and that this lack of virulence is associated to reduced-lung colonization ability after intranasal inoculation (Waligora *et al.*, 2010). Considering the overlap of the AmrZ regulon in both strains (Jones *et al.*, 2014, Martinez-Granero *et al.*, 2014b) it is likely that AmrZ plays a similar role in niche adaption in the rhizosphere and the lung.

Attachment and biofilm formation defects in pseudomonads are associated to defects in exopolysaccharides production and low levels of c-di-GMP. The F113 *amrZ* mutant forms reduced amounts of biofilm when grown in glass tubes and shows reduced attachment to plastic in microtiter plate assays. In order to test for differences in exopolysaccharides production, a Congo Red binding-assay was used. Congo Red binds to different extracellular components including several polysaccharides such as cellulose and to amyloid proteins (Reichhardt *et al.*, 2016, Jones & Wozniak, 2017). The results presented

here, show a different colony morphology and coloring pattern for the wild-type strain and the *amrZ* mutant, indicating alterations in cellular envelopes. However, since the F113 genome does not encode genes for cellulose, *pel* or *psl* synthesis, the exopolysaccharides produced by *P. aeruginosa* and implicated in biofilm formation, the differences observed in F113 should be due to differences in the production of other polysaccharides or other extracellular components. Regarding c-di-GMP levels, the results presented here show that the F113 mutant has severely reduced levels of cytoplasmic c-di-GMP, as revealed by two independent methods: a fluorescent biosensor and direct measurements by LC-MS. These findings fit well with the paradigmatic role of c-di-GMP in determining bacterial life-style, since low levels of c-di-GMP are related to high motility and reduced biofilm formation, supporting a planktonic rather than sessile life-style (Tamayo *et al.*, 2007). However, the phenotypes of c-di-GMP levels in the F113 *amrZ* mutant and the *P. aeruginosa* mutant are opposed, since the *P. aeruginosa amrZ* mutant contains more than two fold more c-di-GMP than the wild-type (Jones *et al.*, 2014). In the case of *P. aeruginosa*, these c-di-GMP levels are in concordance with the hyperbiofilm formation phenotype of the *amrZ* mutant. On the contrary, the high levels of c-di-GMP do not explain the hypermotility phenotype of the mutant. This apparent contradiction might be explained by the direct transcriptional repression of motility genes by AmrZ, observed both in *P. aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014) and *P. fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2014, Barahona *et al.*, 2016). AmrZ is therefore a major determinant of c-di-GMP levels in *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*.

We have shown here that in F113, AmrZ influences the transcription of a majority of the genes encoding enzymes implicated in c-di-GMP turnover. Regulation of c-di-GMP related genes by AmrZ in this strain is mostly transcriptional activation, although five genes, two of them encoding GGDEF proteins and the other three GGDEF-EAL proteins, seem to be repressed by AmrZ. Among the twenty-five genes transcriptionally activated by AmrZ, thirteen encode GGDEF, eight GGDEF-EAL, three EAL and one HD-GYP proteins. These results show that in F113, c-di-GMP levels are controlled by AmrZ in a complex regulatory network and that the low levels of c-di-GMP observed in the *amrZ* mutant are the result of a balance between activation and repression of a large number of genes encoding DGCs and PDEs. These findings contrast with those in *P. aeruginosa* where most of the high c-di-GMP level was attributed to the repression of a single gene encoding a DGC (Jones *et al.*, 2014). Regarding the fourteen c-di-GMP related genes previously identified as putative targets of

AmrZ by ChIP-Seq (Martinez-Granero *et al.*, 2014b), RNA-Seq has confirmed the regulation by AmrZ of eight of them. Six of them showed expression levels that were more than two fold higher than in the wild-type strain indicating that activation was the general trend. Conversely, only one (*dipA*) was shown to be repressed by AmrZ. For three of the genes identified by ChIP-Seq but not appearing as regulated in the RNA-Seq experiment, very low expression, around the limit of detection was observed under the experimental conditions tested. Phenotypic analysis of the eight mutants affected in genes confirmed to be directly regulated by AmrZ, has implicated most of them in biofilm formation, while only three were affected in motility. Two out of these three were affected both in motility and biofilm formation. These results are very similar to those observed in a systematic analysis of the phenotypes of 30 putative DGCs encoded in the *P. fluorescens* Pf-01 genome (Newell *et al.*, 2011), indicating that different c-di-GMP pools, generated and degraded by different enzymes, impact on different pathways for motility and biofilm formation. It is interesting to note that one of these genes did not show any significant role in motility or biofilm formation, at least under our experimental conditions, suggesting that it might be implicated in the regulation of other traits.

We have also found a correlation between motility and biofilm phenotypes and the domains present in the encoded proteins: All of the predicted DGCs (increasing motility and/or decreasing biofilm formation in the mutants), contained a GGDEF motif. Similar results were found with respect to PDEs, since all contained an EAL or HD-GYP motif. On the other hand, phenotypic typing of PSF113_0499, indicates that this gene encodes a DGC. However, this gene is an orthologue of *dipA*, a gene that has been shown to encode a PDE in *P. aeruginosa* (Roy *et al.*, 2012) and possesses a highly degenerated GGDEF motif, unlikely to be catalytic. It is important to remark that we were unable to complement either the biofilm or the motility phenotypes of this mutant with a wild-type copy of the gene, indicating an indirect or gene-copy dependent regulation of these traits by this gene. In *P. aeruginosa* two c-di-GMP related genes have also been shown as targets of AmrZ (Jones *et al.*, 2014). One of these genes, encoding the DGC AdcA (also named GcbA) is an orthologue of the AmrZ regulated PSF113_0661. However, while this gene is AmrZ-repressed in *P. aeruginosa*, it is AmrZ-activated in F113. It is interesting to note that not only genes encoding c-di-GMP enzymes, but also genes encoding sensors or receptors for this molecule such as the PilZ protein FlgZ (Martinez-Granero *et al.*, 2014a) and its *P. aeruginosa*

orthologue are also predicted targets of AmrZ, both in *P. fluorescens* (Martinez-Granero *et al.*, 2014) and in *P. aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014), suggesting that c-di-GMP sensing is also implicated in AmrZ regulation.

Conclusions

AmrZ is a global regulator required for niche adaption in *Pseudomonas fluorescens* and *P. aeruginosa*. An important part of AmrZ activity is to modulate the intracellular levels of c-di-GMP, which in turn regulates swimming motility and biofilm formation, among other adaptive traits. While in *P. aeruginosa* AmrZ contributes to a lowering in c-di-GMP levels, in *P. fluorescens* AmrZ increases the levels of the messenger molecule. Taken together, the results presented here show that although AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels by regulating the expression of genes encoding DGCs and PDEs in *P. fluorescens* F113 and *P. aeruginosa* PAO1, regulation is very different in both strains. While in PAO1 only one gene encoding a DGC and one encoding a PDE are transcriptionally repressed, in F113 c-di-GMP levels are the consequence of activation and repression of a complex network of genes encoding many of the DGCs and PDEs present in the bacterium.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. Maribel Ramos and Ms. Maria Luisa Travieso (Estación Experimental del Zaidín, CSIC) for help with the pCdrA biosensor.

References

- Allsopp LP**, Wood TE, Howard SA, Maggiorelli F, Nolan LM, Wettstadt S & Filloux A (2017) RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**: 7707-7712.
- Amikam D & Galperin MY** (2005) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6.
- Anders S**, Pyl PT & Huber W (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166-169.
- Ausmees N**, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M & Lindberg M (2001) Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS microbiology letters* **204**: 163-167.
- Barahona E**, Navazo A, Yousef-Coronado F, Aguirre de Carcer D, Martinez-Granero F, Espinosa-Urgel M, Martin M & Rivilla R (2010) Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ Microbiol* **12**: 3185-3195.
- Barahona E**, Navazo A, Garrido-Sanz D, Muriel C, Martínez-Granero F, Redondo-Nieto M, Martín M & Rivilla R (2016) *Pseudomonas fluorescens* F113 can produce a second flagellar apparatus, which is important for plant root colonization. *Front Microbiol* **7**.
- Baynham PJ & Wozniak DJ** (1996) Identification and characterization of AlgZ, an AlgT-dependent DNA-binding protein required for *Pseudomonas aeruginosa* *algD* transcription. *Molecular microbiology* **22**: 97-108.
- Baynham PJ**, Ramsey DM, Gvozdyev BV, Cordonnier EM & Wozniak DJ (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *Journal of bacteriology* **188**: 132-140.
- Capdevila S**, Martinez-Granero FM, Sanchez-Contreras M, Rivilla R & Martin M (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889-3897.
- Choy WK**, Zhou L, Syn CK, Zhang LH & Swarup S (2004) MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* **186**: 7221-7228.
- de Lorenzo V**, Eltis L, Kessler B & Timmis KN (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^q/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.
- Fouhy Y**, Lucey JF, Ryan RP & Dow JM (2006) Cell-cell signaling, cyclic di-GMP turnover and regulation of virulence in *Xanthomonas campestris*. *Res Microbiol* **157**: 899-904.
- Guvener ZT & McCarter LL** (2003) Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **185**: 5431-5441.
- Hay ID**, Remminghorst U & Rehm BH (2009) MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1110-1120.
- Jones CJ**, Ryder CR, Mann EE & Wozniak DJ (2013) AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon. *Journal of bacteriology* **195**: 1637-1644.
- Jones CJ**, Newsom D, Kelly B, *et al.* (2014) ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **10**: e1003984.
- Jones CJ & Wozniak DJ** (2017) Congo Red stain identifies matrix overproduction and is an indirect measurement for c-di-GMP in many species of bacteria. *Methods Mol Biol* **1657**: 147-156.
- King EO**, Ward MK & Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.
- Kirchner O & Tauch A** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**: 287-299.
- Kovach ME**, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Langmead B & Salzberg SL** (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**: 357-359.
- Li H**, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R & Genome Project Data Processing S (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078-2079.

- Little RH**, Grenga L, Saalbach G, Howat AM, Pfeilmeier S, Trampari E & Malone JG (2016) Adaptive remodeling of the bacterial proteome by specific ribosomal modification regulates pseudomonas infection and niche colonisation. *PLoS Genet* **12**: e1005837.
- Lohse M**, Bolger AM, Nagel A, Fernie AR, Lunn JE, Stitt M & Usadel B (2012) RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res* **40**: 622-627.
- Love MI**, Huber W & Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550.
- Malone JG**, Jaeger T, Spangler C, Ritz D, Spang A, Arrieumerlou C, Kaever V, Landmann R & Jenal U (2010) YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* **6**: e1000804.
- Martinez-Granero F**, Rivilla R & Martin M (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Applied and environmental microbiology* **72**: 3429-3434.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS One* **7**: e31765.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Gonzalez de Heredia E, Baena I, Martin-Martin I, Rivilla R & Martin M (2014a) Identification of *flgZ* as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PLoS One* **9**: e87608.
- Martinez-Granero F**, Redondo-Nieto M, Vesga P, Martin M & Rivilla R (2014b) AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P. fluorescens* F113. *BMC Genomics* **15**: 237.
- Mortazavi A**, Williams BA, McCue K, Schaeffer L & Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**: 621-628.
- Muriel C**, Jalvo B, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2015) Chemotactic motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under aerobic and denitrification conditions. *PLoS One* **10**: e0132242.
- Navazo A**, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martínez-Granero F, Rivilla R & Martín M (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial biotechnology* **2**: 489-498.
- Newell PD**, Yoshioka S, Hvorecny KL, Monds RD & O'Toole GA (2011) Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol* **193**: 4685-4698.
- Paulsen IT**, Press CM, Ravel J, et al. (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature biotechnology* **23**: 873-878.
- Peeters E**, Nelis HJ & Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72**: 157-165.
- Pfeilmeier S**, Saur IM, Rathjen JP, Zipfel C & Malone JG (2016) High levels of cyclic-di-GMP in plant-associated *Pseudomonas* correlate with evasion of plant immunity. *Mol Plant Pathol* **17**: 521-531.
- Phippen CW**, Mikolajek H, Schlaefli HG, Keevil CW, Webb JS & Tews I (2014) Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. *FEBS Lett* **588**: 4631-4636.
- Prada-Ramirez HA**, Perez-Mendoza D, Felipe A, Martinez-Granero F, Rivilla R, Sanjuan J & Gallegos MT (2016) AmrZ regulates cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular microbiology* **99**: 960-977.
- Reichhardt C**, McCrate OA, Zhou X, Lee J, Thongsomboon W & Cegelski L (2016) Influence of the amyloid dye Congo red on curli, cellulose, and the extracellular matrix in *E. coli* during growth and matrix purification. *Anal Bioanal Chem* **408**: 7709-7717.
- Roy AB**, Petrova OE & Sauer K (2012) The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. *Journal of bacteriology* **194**: 2904-2915.
- Rybtke MT**, Borlee BR, Murakami K, Irie Y, Hentzer M, Nielsen TE, Givskov M, Parsek MR & Tolker-Nielsen T (2012) Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 5060-5069.
- Schäfer A**, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Scher FM & Baker R** (1982) Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* **72**: 1567-1573.

- Simm R**, Morr M, Kader A, Nimtz M & Romling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology* **53**: 1123-1134.
- Tamayo R**, Pratt JT & Camilli A (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **61**: 131-148.
- Tart AH**, Blanks MJ & Wozniak DJ (2006) The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J Bacteriol* **188**: 6483-6489.
- Tischler AD & Camilli A** (2004) Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* **53**: 857-869.
- Waligora EA**, Ramsey DM, Pryor E, E. J, Lu H, Hollis T, Sloan GP, Deora R & Wozniak DJ (2010) AmrZ beta-sheet residues are essential for DNA binding and transcriptional control of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *J Bacteriol* **192**: 5390-5401.
- Wei C**, Jiang W, Zhao M, Ling J, Zeng X, Deng J, Jin D, Dow JM & Sun W (2016) A systematic analysis of the role of GGDEF-EAL domain proteins in virulence and motility in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Sci Rep* **6**: 23769.
- Winsor GL**, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA & Brinkman FS (2016) Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res* **44**: D646-653.

Supplementary

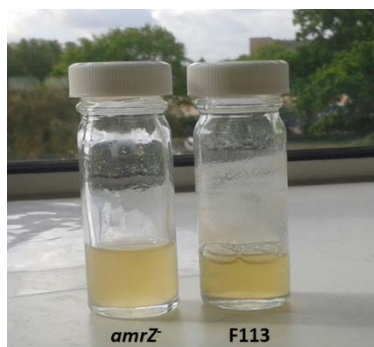


Figure S2.1: Biofilms formation on glass tubes.

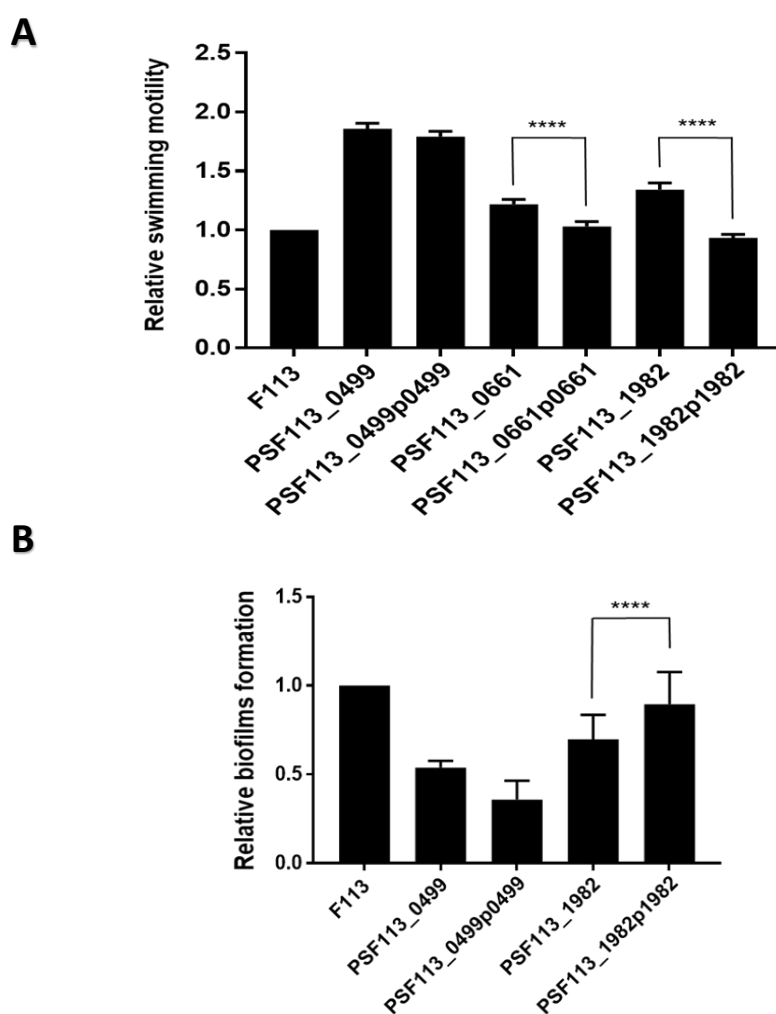


Figure S2.2: Phenotype complementation analysis of the mutants. (A) Swimming motility phenotypes of *P. fluorescens* F113, PSF113_0499, PSF113_0661 and PSF113_1982 mutants and complementation analysis of each mutant. **(B)** Biofilm formation (attachment) phenotypes of *P. fluorescens* F113, PSF113_0499 and PSF113_1982 mutants and complementation analysis of each mutant. Experiments and replicas were performed as in Fig. 2. 1. Asterisks represent statistical significance of the data: **** $p < 0.0001$.

2. AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *P. fluorescens* F113

Strains	Description	Reference
<i>P. fluorescens</i>		
F113	<i>P. fluorescens</i> F113 wild type, Rif ^R	(Shanahan <i>et al.</i> , 1992)
<i>amrZ</i> ⁻	F113 <i>amrZ</i> ⁻ , Rif ^R Km ^R	(Martinez-Granero <i>et al.</i> , 2012)
PSF113_0499	F1130049, Rif ^R Km ^R	This work
PSF113_0661	F1130661, Rif ^R Km ^R	This work
PSF113_0715	F1130715, Rif ^R Km ^R	This work
PSF113_1982	F1131982, Rif ^R Km ^R	This work
PSF113_3553	F1133553, Rif ^R Km ^R	This work
PSF113_4038	F1134038, Rif ^R Km ^R	This work
PSF113_4681	F1134681, Rif ^R Km ^R	This work
PSF113_4827	F1134827, Rif ^R Km ^R	This work
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>E. coli</i> cloning strain: $\Phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, <i>U169</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK,mK+</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44-lac-thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Gibco-BRL
Plasmids		
pCR2.1 TOPO	Cloning vector, Km ^R	Life Technologies
pK18 <i>mobsacB</i>	Suicide vector for allelic exchange; pUC18 derivative <i>lacZ mob</i> site <i>sacB</i> , Km ^R	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pG18 <i>mob2</i>	Suicide vector <i>sacB</i> , Gn ^R	(Kirchner & Tauch, 2003)
pVLT31	IPTG-inducible expression vector, Tet ^R	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993)
pBBR1MCS-5	Replicative plasmid with <i>lacZ</i> promoter for overexpression, Gn ^R	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pRK600	Helper vector Cm ^R	(Finan <i>et al.</i> , 1986)
pBG1759	pVLT31 containing the <i>amrZ</i> gene (<i>pamrZ</i>), Tet ^R	This work
pBG2059	pK18 <i>mobsacB</i> derivative with a 500 bp SalI-SphI fragment of F1130499 gene, Km ^R	This work
pBG2081	pK18 <i>mobsacB</i> derivative with a 690 bp EcoRI fragment of F1130661 gene, Km ^R	This work
pBG2092	pK18 <i>mobsacB</i> derivative with a 500 bp EcoRI fragment of F1130715 gene, Km ^R	This work
pBG2101	pK18 <i>mobsacB</i> derivative with a 518 bp EcoRI fragment of F1131982 gene, Km ^R	This work
pBG2099	pK18 <i>mobsacB</i> derivative with a 675 bp EcoRI fragment of F1133553 gene, Km ^R	This work
pBG2086	pK18 <i>mobsacB</i> derivative with a 672 bp EcoRI fragment of F1134038 gene, Km ^R	This work
pBG2090	pK18 <i>mobsacB</i> derivative with a 1200 bp EcoRI fragment of F1134681 gene, Km ^R	This work
pBG2027	pG18 <i>mob2</i> derivative with a 700 bp EcoRI fragment of F1134827 gene, Km ^R	This work
pBG2065	pBBRMCS-5 with 0499 gene cloned at HindIII/XbaI site, Gn ^R	This work
pBG2135	pBBRMCS-5 with 0661 gene cloned at HindIII/XbaI site, Gn ^R	This work
pBG2128	pBBRMCS-5 with 1982 gene cloned at KpnI/HindIII site, Gn ^R	This work

Table S2.1: Bacterial strains and plasmids used in this study.

Domain	Locus	log ₂ FC	p-value	q-value
EAL	PSF113_0044	-1.852801854	4.514E-51	5.10767E-50
EAL	PSF113_3487	-0.906837059	3.42484E-10	1.33594E-09
EAL	PSF113_2319	-0.721411243	1.10679E-08	3.94189E-08
GGDEF & EAL	PSF113_4681	-1.793986383	0	0
GGDEF & EAL	PSF113_2516	-1.370520403	7.1204E-235	3.5395E-233
GGDEF & EAL	PSF113_5478	-0.89854943	2.7552E-96	5.39536E-95
GGDEF & EAL	PSF113_1902	-0.831517375	7.36236E-45	7.45984E-44
GGDEF & EAL	PSF113_3576	-0.684428407	2.87732E-54	3.4152E-53
GGDEF & EAL	PSF113_5372	-0.681158131	6.761E-49	7.36366E-48
GGDEF & EAL	PSF113_0206	-0.66618906	4.81523E-10	1.86454E-09
GGDEF & EAL	PSF113_1628	-0.629662824	1.9859E-65	2.79661E-64
GGDEF & EAL	PSF113_4682	-0.390844676	2.07592E-25	1.38142E-24
GGDEF & EAL	PSF113_5064	-0.047522371	0.518449564	0.627926419
GGDEF & EAL	PSF113_5854	-0.047262242	0.700614696	0.781956452
GGDEF & EAL	PSF113_1323	-0.025626022	0.636232474	0.731001199
GGDEF & EAL	PSF113_4023	0.105646332	0.106127516	0.169291727
GGDEF & EAL	PSF113_4360	0.107343568	0.68059559	0.766823702
GGDEF & EAL	PSF113_2333	0.110695086	0.444282901	0.560874615
GGDEF & EAL	PSF113_0181	0.142150889	0.118124501	0.185930202
GGDEF & EAL	PSF113_0499	0.538604403	6.90144E-16	3.41316E-15
GGDEF & EAL	PSF113_5738	0.747956746	6.70964E-10	2.5809E-09
GGDEF & EAL	PSF113_3703	1.43989134	2.6272E-32	2.04549E-31
GGGDEF	PSF113_4827	-1.698102576	8.354E-137	2.2704E-135
GGGDEF	PSF113_0661	-1.52776552	1.872E-89	3.42375E-88
GGGDEF	PSF113_1982	-1.515026842	4.41271E-54	5.20575E-53
GGGDEF	PSF113_1376	-1.44544019	3.7312E-75	5.89693E-74
GGGDEF	PSF113_2514	-1.388611892	5.13796E-72	7.88454E-71
GGGDEF	PSF113_0986	-1.189448679	0.262071851	N.A.
GGGDEF	PSF113_4038	-1.171864704	2.7733E-39	2.49683E-38
GGGDEF	PSF113_1391	-1.066982072	1.37202E-11	5.74077E-11
GGGDEF	PSF113_3939	-1.041108731	8.7103E-19	4.76567E-18
GGGDEF	PSF113_2438	-0.784777602	8.24607E-23	5.10204E-22
GGGDEF	PSF113_4657	-0.680393512	7.19976E-08	2.44162E-07
GGGDEF	PSF113_1630	-0.667439514	6.87376E-72	1.05205E-70
GGGDEF	PSF113_2827	-0.489219108	0.585035853	N.A.
GGGDEF	PSF113_0715	-0.486246402	0.003245028	0.007031701
GGGDEF	PSF113_1090	-0.17408767	0.080885229	0.133303625
GGGDEF	PSF113_0017	-0.148219873	0.186396758	0.274312637
GGGDEF	PSF113_0042	-0.082923382	0.432304489	0.548610715
GGGDEF	PSF113_4776	0.251289838	0.001757575	0.003952844
GGGDEF	PSF113_3796	0.26475815	0.006274119	0.012948998
GGGDEF	PSF113_5392	0.397196264	0.031163349	0.056480535
GGGDEF	PSF113_0179	1.266635792	1.8496E-110	3.999E-109
GGGDEF	PSF113_2525	1.430122104	1.4973E-42	1.44656E-41
HD-GYP , HDOD	PSF113_3553	-1.601093608	2.82826E-23	1.77063E-22

Table S2.2. AmrZ transcriptional regulation of genes implicated in c-di-GMP turnover. Log₂ Fold change of *amrZ* mutant expression against F113 wild-type in all genes with diguanylate cyclases and/or phosphodiesterase domains. Statistical significance is shown by p and q values. N.A.: Not Available

References

- de Lorenzo V**, Eltis L, Kessler B & Timmis KN (1993) Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/P_{trp}-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.
- Finan TM**, Kunkel B, De Vos GF & Signer ER (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of bacteriology* **167**: 66-72.
- Kirchner O & Tauch A** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of biotechnology* **104**: 287-299.
- Kovach ME**, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS one* **7**: e31765.
- Schäfer A**, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Shanahan P**, O'Sullivan D J, Simpson P, Glennon JD & O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and environmental microbiology* **58**: 353-358.

Capítulo 3

c-di-GMP is involved in flagellum synthesis in *Pseudomonas fluorescens* F113

(In preparation)

Summary

Flagellum mediated motility is an essential trait for rhizosphere colonization by pseudomonads. Flagella synthesis is a complex process, energetically expensive that is tightly regulated. The regulatory cascade starts with the master regulatory protein FleQ which is in turn regulated by environmental signals through the Gac and SadB pathways, which converge in AlgU. This sigma factor is required for the expression of *amrZ*, encoding a FleQ repressor. AmrZ itself has been shown to modulate c-di-GMP levels through the control of many genes encoding enzymes implicated in c-di-GMP turnover. This cyclic nucleotide has been shown to regulate flagellar function and two proteins participating in the flagellar synthesis signaling pathway, SadB and FleQ have been shown to bind it. Here we show that at least two diguanylate cyclases (DGCs) regulated by AmrZ (GcbA and AdrA) and two novel HDOD proteins (HdmA and HdmB) participate in this signaling pathway. Epistasis analysis has shown that GcbA acts downstream of SadB, but AdrA acts upstream, linking SadB with environmental signaling. HdmA and HdmB are motility activators and HdmA acts directly on flagellar synthesis, since its mutant shows a high reduction in the expression of *fliC*, which encodes flagellin. According to genetic and biochemical analysis, both, HdmA and HdmB act downstream of GacA and SadB and could be sensing c-di-GMP produced by GcbA.

Introduction

The pseudomonads are motile bacteria able to swim and swarm by means of polar flagella. The flagella are also used in the initial attachment to bacteria to surfaces (Deflaun *et al.*, 1994), and are therefore important for biofilm formation (O'Toole & Kolter, 1998). Flagellar motility is an important trait for rhizosphere colonization (de Weert *et al.*, 2002, Capdevila *et al.*, 2004, Muriel *et al.*, 2015). In the biocontrol bacteria *Pseudomonas fluorescens* F113 it has been shown that hypermotile variants arise during rhizosphere colonization (Martinez-Granero *et al.*, 2006) and that this trait is more important than the ability to form biofilms for the competitive colonization of the rhizosphere (Barahona *et al.*, 2010).

Biosynthesis of the flagellar apparatus is an expensive process that requires the expression of many genes and therefore, is tightly regulated. A regulatory cascade initiated by the master regulator FleQ and the sigma factor FliA results in the ordered production and assemblage of the flagellar components resulting in a functional flagellum (Arora *et al.*, 1997, Dasgupta *et al.*, 2003). However, the initiation of this regulatory cascade, is also regulated by environmental cues and yet unknown signals. We have previously shown that in *P. fluorescens* F113 two signal transduction pathways, one initiated by the SadB protein and other by the GacA/GacS two component system converge in the production of the AlgU sigma factor (Martinez-Granero *et al.*, 2012). This sigma factor is required for the expression of the *amrZ* gene, which encodes a global and bifunctional transcriptional regulator, implicated in the expression of hundreds of genes both in *P. fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2014b) and *Pseudomonas aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014). AmrZ is a strong transcriptional repressor of the gene encoding the flagellar master regulator FleQ in both strains (Tart *et al.*, 2006, Martinez-Granero *et al.*, 2012).

Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) is also an important player in processes related to motility and biofilm formation (Hengge, 2009). Low c-di-GMP levels are associated with high motility and a planktonic life-style, while high levels are associated with the production of exopolysaccharides and biofilm formation and therefore, with a sessile life-style (Simm *et al.*, 2004). The levels of c-di-GMP are the result of the action of two enzymes, diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs), which carry out the synthesis and degradation of this molecule, respectively (Tal *et al.*, 1998). DGCs are

proteins that contain GGDEF domains (Ausmees *et al.*, 2001), while PDEs either contain EAL (Simm *et al.*, 2004) or HD-GYP (Aravind & Koonin, 1998) domains.

c-di-GMP has been implicated in flagellar function in pseudomonads and other bacteria, including the energization of the apparatus through the Flil ATPase (Trampari *et al.*, 2015), controlling the rotation speed (Martinez-Granero *et al.*, 2014a, Baker *et al.*, 2016) and the reversal frequency (Petrova *et al.*, 2014). However, the implication of c-di-GMP in flagellar synthesis has been less investigated. We have recently shown that AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *P. fluorescens* F113 by controlling the transcription of multiple genes encoding DGCs, PDEs and c-di-GMP sensing proteins (Muriel *et al.*, 2018). Other two proteins implicated in flagellar synthesis, SadB (Trampari, 2016) and FleQ (Hickman & Harwood, 2008) have been shown to bind c-di-GMP. The specific role of c-di-GMP upon its binding to SadB is unknown but binding of this cyclic nucleotide to FleQ represses flagella synthesis (Baraquet & Harwood, 2013). The aim of this work is to investigate possible roles of c-di-GMP in the biogenesis of the flagellar apparatus, as well as novel proteins implicated in its production or sensing and affecting this process in *P. fluorescens* F113.

Material and Methods

Strains and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Supplementary table 3.1. *P. fluorescens* F113 and derivatives were grown in SA medium (Scher & Baker, 1982) or LB medium (Bertani, 1951) at 28°C. *E. coli* strains were grown in LB medium at 37°C or 28°C for protein overexpression. When required, the media were supplemented with bacteriological agar (1.5%) and/or antibiotics. In the case of pseudomonas strains: Rifampicin (Rif), 100 µg/mL; Tetracycline (Tet), 70 µg/mL; Kanamycin (Km), 50 µg/mL; Gentamicin (Gm), 3 µg/mL and Spectinomycin (Spc), 100 µg/mL. For *E. coli* strains the antibiotic concentrations were: Kanamycin (Km), 25 µg/mL; Tetracycline (Tet), 10 µg/mL; Gentamicin (Gm), 10 µg/mL and Ampicillin (Amp), 100 µg/mL. For induction with pETNdeM-11, β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 1mM.

Molecular procedures

Routine molecular methods, including plasmid DNA extraction, cloning, restriction digests, electrophoresis, purification of DNA fragments and sequencing were performed in accordance with standards procedures.

Mutants were obtained either by Tn5 mutagenesis using pCAM140 vector (Wilson *et al.*, 1995) or by homologous recombination of an amplified internal fragment of the gene, cloned into the suicide vectors pK18*mobsacB* (Schafer *et al.*, 1994), pG18*mob2* (Kirchner & Tauch, 2003) or pCR2.1 TOPO cloning (Life Technologies). Plasmids were mobilized into F113 by electroporation. Further information about mutant's construction is shown in Supplementary Table 3.1. All mutants were checked by PCR and by Southern blotting. Complementation of mutants and overexpression of genes was performed by expressing a wild-type copy of the gene in expression vectors pBBR1MCS.5 and pME6032(Supplementary Table 3.1).

Total RNA was extracted from *P. fluorescens* F113 and derivatives, grown in LB medium at exponential OD (OD₆₀₀=0.8), following the instructions included in SV Total RNA Isolation System (Promega). The concentration and quality of RNA was determined using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA integrity was confirmed in 0.8

% (w/v) agarose gels. In addition, genomic DNA contamination in the samples was analysed by PCR. Complementary DNA (cDNA) synthesis by reverse transcription (RT-PCR) was performed using Superscript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) from 1 µg of extracted RNA. q-RT-PCR analysis, with 1 µl of cDNA synthesized, were carried out in triplicate for each gene using FastStart Universal SYBR Green Master Rox (Roche). Gene expression was normalized to the level of the endogenous housekeeping gene *16S rRNA* and normalized to the wt reference sample following the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

Phenotypic analysis.

Swimming motility assays were determined in SA (for *P. fluorescens*) or LB (for *E. coli*) plates containing 0.3% purified agar as described before (Navazo *et al.*, 2009). To induce expression of vector promoters, IPTG at 0.25 mM was used. Swimming haloes diameters were measured after 24 hours of incubation at 28°C. Every assay was performed at least three times with three replicates in each experiment.

Biofilm formation assays were performed by a modified version of a previously described quantification method (Peeters *et al.*, 2008). Briefly, overnight cultures grown in LB medium were adjusted to OD₆₀₀ at 0.8 into a fresh LB and incubated at 28°C for 2 hours in 96-well-microlitre plates. After Crystal Violet staining and washing, absorbance of the eluted crystal violet was measured at OD₅₉₀ on a Synergy HT multi-mode microplate reader (BioTek, Wilusky, VT, USA). Experiments were repeated three times with 16 technical replicas in each assay.

Protein purification

To produce recombinant proteins, *E. coli* BL21 (DE3) strains carrying the cloned gene fused to the His-tag in the pETNdeM-11 vector (Little *et al.*, 2011) were used (Supplementary table 3.1). For the overexpression, preinocula were grown in 5 ml of LB cultures at 37°C overnight (O/N) and after were inoculate into 50 ml of LB medium in a 1:50 ratio. The overexpression cultures were then grown at 28°C to an OD₆₀₀ of 0.6 before protein expression was induced with 1 mM IPTG for 3h at 28°C. Cells were collected by centrifugation at 7000 rpm for 10 minutes and resuspended in binding buffer (20mM HEPES, 250mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2.5% glycerol, pH 6.8). Resuspension pellets were stored frozen

until required. Cells were then lysed by sonication on ice, and the soluble protein fraction was recovered by centrifugation at 19000 rpm for 30 minutes and 4°C.

His₆-tagged proteins were purified by NTA-Ni chromatography, in 1 ml nickel-charge HisTrap chelating HP columns (GE Healthcare). For the purifications, an AKTA Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system was used (AKTA pure chromatography system, GE Healthcare, Life Sciences). The columns were equilibrated and extensively washed with 10 volumes of binding buffer. The absorbed proteins were eluted by adding a linear gradient of imidazole up to 1M in the binding buffer. The purity of the proteins was checked by SDS-PAGE analysis gels stained with InstanBlue (Expedeon) for 1 hour with shaking. Gels were destained with water O/N. His₆-tagged proteins were quantified using the Bradford method (Bradford, 1976).

Differential Radial Capillary of Ligand Assay (DRaCALA)

The method was performed by a modified version as described Roelofs (Roelofs *et al.*, 2011). 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP was used (BioLog 009) at a concentration of 6µM. 2 mg/µl of purified proteins were incubated for 2 min at room temperature with 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP in reaction buffer (100 µM Tris). 5µl of each sample were then spotted on nitrocellulose filter (GE Healthcare), samples were dried, and results were visualized using a charge-coupled device camera (GE Typhoon FLA 7000 fluorescence scanner) with filter Alexa 488 filter) BldD was used as positive control (Tschowri *et al.*, 2014) and BSA as negative control

Streptavidin UV Precipitation (SUPr) assay.

The Streptavidin UV Precipitation (SUPr) assay, described by (Nesper *et al.*, 2012) was carry out with some modification. Purified proteins were incubated with biotinylated c-di-GMP (BioLog B098) at a final concentration of 30 µM. The mixture was incubated O/N on a rotary wheel at 4°C. UV cross-linking was carried out using a UV Stratalinker (Stratagene) for 4 min on ice, to stabilise c-di-GMP/protein complexes. 56 µl of Streptavidin magnetic beads (Invitrogen) were added to the mixture, and incubated for 1 h. on a rotary wheel at 4°C. A magnet was used to isolate the Streptavidin magnetic beads and five washing steps were carried out using 500 µl of the protein wash buffer each time (20 mM HEPES pH 7.5, 250 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, and 2.5% (v/v) glycerol pH 6.8), to remove non-bound proteins.

The washed Streptavidin beads were resuspended in 12.5 μ l wash buffer, 2x SDS loading buffer was added, incubated at 95°C for 10 min and then pulled on a 12% SDS-PAGE protein gel. The gel was then developed using InstantBlue (Expedeon). BSA was used like negative control.

Surface plasmon resonance (SPR)

SPR for the c-di-GMP binding analysis was conducted using a Biacore T200 system. All measurements were recorded at 25°C using the ReDCaT system described by (Stevenson *et al.*, 2013). 100nM biotinylated cdG (Biolog B098) was immobilized on a single NTA sensor chip (GE Healthcare, BR100407) at a final immobilization level of 80 RU, with a flow rate of 5 μ L/ min. An empty cell was used as a reference for subtraction of non-specific interactions. After the immobilization, the chip was washed with 1M NaCl, 50mM NaOH. The protein samples were prepared at the following diluted concentrations (μ M): 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39 and 0.19 in SPR running buffer (10mM HEPES, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20, 2mM MgCl₂) and were injected with a flow rate of 5 μ l/min over the chip for 60 sec, 90 sec or 120 sec until they reached their saturation level. The buffer was then injected onto the chip for 60 or 90 sec for the calculation of the disassociation time of the protein from the chip. 1M NaCl was used after each injection for chip regeneration. For each protein concentration, three replicates were included. Measurements were taken in triplicate for a range of protein concentrations to calculate the proteins K_d by a kinetic approach. All sensograms were analyzed using Biacore T200 BiaEvaluation software version 1.0 (GE Healthcare). The data were then plotted using GraphPad Prism 7.00 (GraphPad software, La Jolla, California, USA).

Statistical analysis

GraphPad Prism 7.00 was used for the statistical analysis of all tested phenotypes, the comparison was done using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's correction of multiple comparison test ($p \leq 0.05$).

Results

The DGCs GcbA and AdrA are involved in the flagellar synthesis pathway.

GcbA (PSF113_0661) is a PleD-like response regulator protein, which contains a REC domain and a diguanylate cyclase domain harboring a conserved active-site GGDEF motif (Fig.3.1A). AdrA (PsF113_1982) is membrane associated protein with an N-terminal extracellular MASE domain and a C-terminal, cytoplasmic GGDEF domain (Fig. 3.1B). Both DGCs has been previously shown to be positively regulated by AmrZ and to have a hypermotility phenotype (Muriel *et al.*, 2018). In order to determine whether they were implicated in the flagellar synthesis pathway, we constructed double mutants affected also in the *sadB* gene, which encodes an HDOD protein implicated in regulation of flagellar synthesis (Navazo *et al.*, 2009, Martinez-Granero *et al.*, 2012). As shown in Figure 3.1C, the *sadB* mutant showed a hypermotility phenotype stronger than in the *gcbA* or *adrA* mutants. Both double mutants showed a non-additive phenotype, indicating genetic interaction between the genes encoding both DGCs and *sadB*. However, the two double mutants behaved differently, since in the *gcbAsadB* mutant, the phenotype of *gcbA* was dominant while in the *adrAsadB* mutant, the phenotype of *sadB* was the dominant. Similar results were obtained for the biofilm (initial attachment) phenotypes (Fig. 3.1D). The mutants in *sadB* and *adrA* showed a strong reduction in initial attachment when compared with the wild-type strain. No phenotype was observed for the *gcbA* mutant. However, mutation in *gcbA* suppressed the phenotype of the *sadB* mutation, since the double mutant showed a biofilm formation ability similar to the wild-type strain and the *gcbA* mutant. In the case of the *adrAsadB* double mutant, the phenotype was non-additive and was undistinguishable from the phenotypes of the individual mutants. These results also indicate interaction between the genes encoding both DGCs and *sadB*. Taken together, these results suggest that the three genes participate in the same pathway for the regulation of flagella synthesis, with *adrA* acting upstream of *sadB* and *gcbA* downstream.

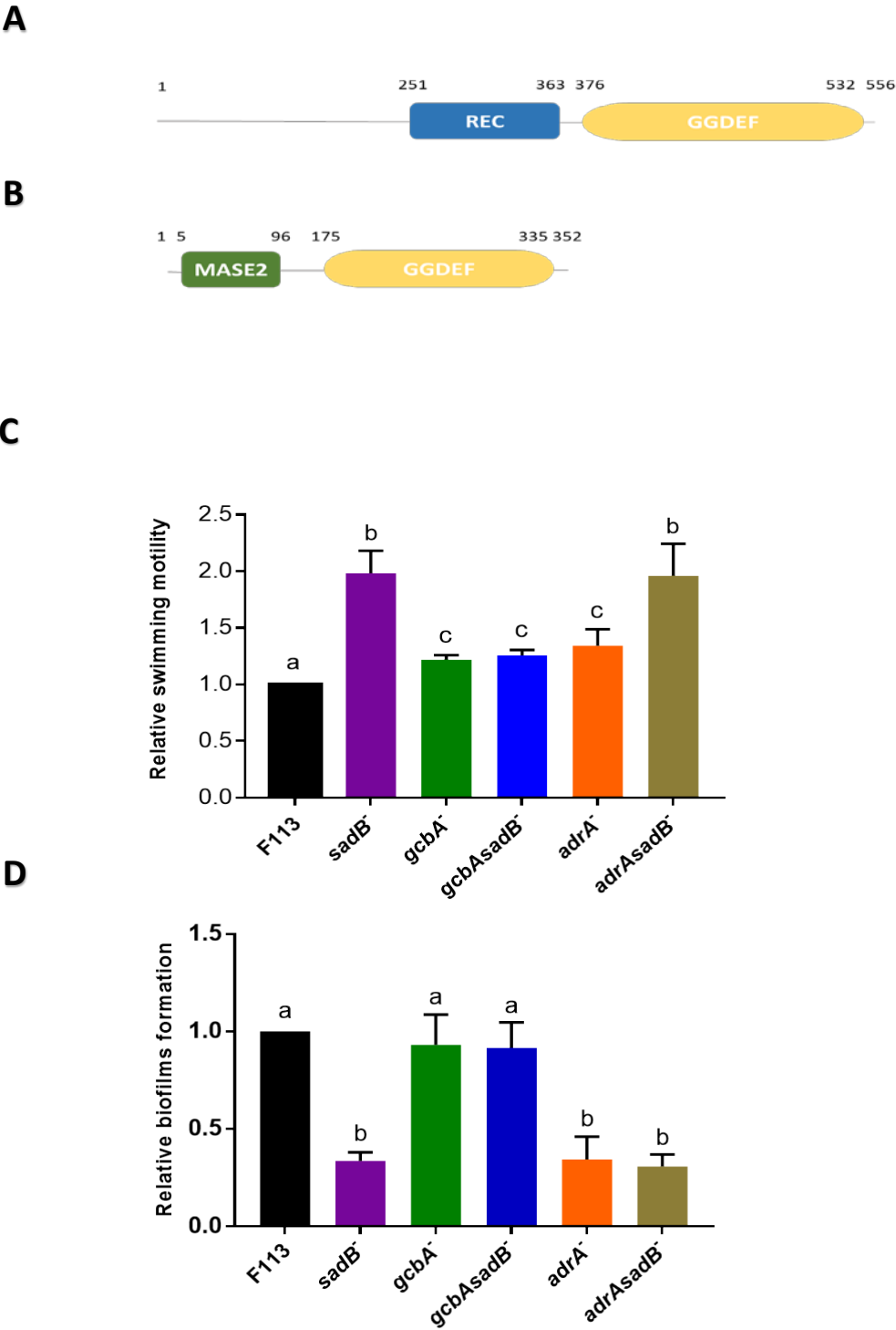


Figure 3.1: The DGCs GcbA and AdrA are involved in the flagellar synthesis pathway. Schematic predicted domains of the **(A)** PSF113_0661, GcbA and **(B)** PSF113_1982, AdrA proteins. Numbers indicate amino acids corresponding to the start and the end of the proteins and respective domains. **(C)** Relative swimming motility and **(D)** relative biofilms formation of *P. fluorescens* F113 simple or double mutants affected in DGCs: *gcbA* and *adrA* genes; and *sadB* gene. Averages of at least three triplicated assays plus standard deviation is shown. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Two novel HDOD domain proteins are implicated in the regulation of swimming motility.

The *SadB* protein harbours a HDOD domain, which does not have a phosphodiesterase activity. This domain could act as a c-di-GMP binding domain (Galperin 2006; Merritt et al., 2007). The *P. fluorescens* F113 genome encodes another two proteins that have HDOD domains that are conserved with the *SadB* domain (Fig. 3.2A). These proteins are encoded by PSF113_1408 and PSF113_5572. In order to test the possible implication of these proteins in the regulation of swimming motility and biofilm formation, mutants affected in both genes were tested for swimming motility (Fig. 3.2B). Conversely to the hypermotility of the *sadB* mutant, both mutants showed a severe motility defect, indicating that both genes regulate motility positively. A wild-type copy of the genes expressed from a plasmid complemented the motility defects (Supplementary Fig 3.1). We have named these genes *hdmA* (PsF113_1408) and *hdmB* (PsF113_5572) for HD motility regulators A and B. However, we did not find a significant effect of the mutations in biofilm formation, indicating that *hdmA* and *hdmB* do not seem to be important for the initial attachment to plastic surfaces, as *sadB* is (Fig 3.2C). In order to test whether *hdmA* and *hdmB* were implicated in flagella synthesis, we performed a RT-PCR analysis of the expression of the *fliC* gene, which encodes flagellin, the structural component of the flagellar filament. As shown in Figure 3.2D, the mutant in *sadB* shows a significant increment in the expression of *fliC*, reflecting its role in the negative regulation of flagella synthesis. Conversely, the mutant affected in *hdmA*, showed a very strong reduction in *fliC* expression, indicating that this gene encodes a positive regulator of flagella synthesis. No significant effect on *fliC* expression was observed for the *hdmB* mutant. Furthermore, we tested that these HDOD proteins did not act as phosphodiesterases (Supplementary Fig 3.2).



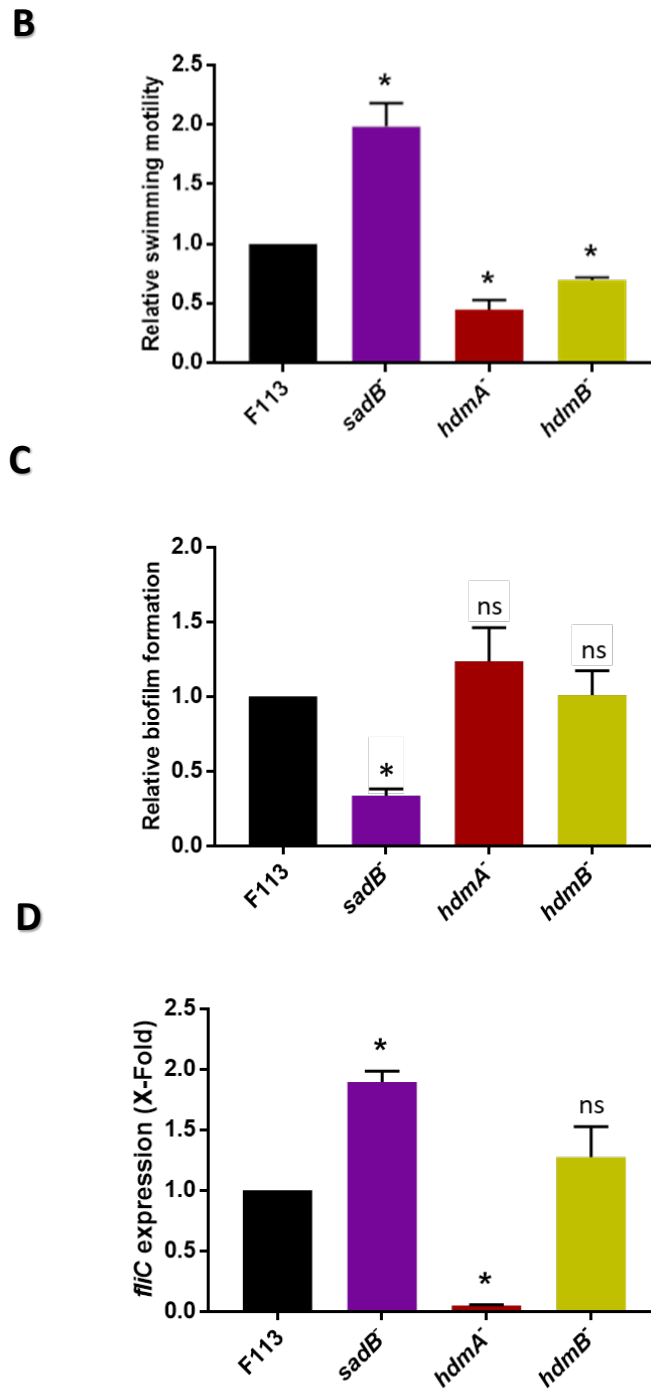


Figure 3.2: Two novel HDOD domain proteins are implicated in the regulation of swimming motility. (A) Schematic predicted domains of the SadB, HdmA and HdmB proteins. Numbers indicate amino acids corresponding to the start and the end of the proteins and respective domains. (B) Relative swimming motility and (C) relative biofilms formation of *P. fluorescens* F113 and derivative mutants *sadB*, *hdmA* and *hdmB*. Averages of at least three triplicated assays plus standard deviation is shown. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). (D) q-RT-PCR analysis of *fliC* transcript abundance. *fliC* expression seems to be regulated by *sadB* and *hdmA* genes. Expression relative to F113 is shown as average plus standard deviation. Asterisk indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

hdmA and *hdmB* participate in the same regulatory pathway than *sadB* and *gacA*

We have previously shown that in *P. fluorescens* F113 *sadB* and *gacA* converge on the regulation of *algU* to repress flagella synthesis (Martinez-Granero *et al.*, 2012). In order to test whether *hdmA* and *hdmB* also participate in this pathway, we performed an epistasis analysis through the study of the swimming and biofilm forming phenotypes of a collection of double mutants. First, we tested the swimming phenotype of the *hdmAB* double mutant. As shown in Figure 3.3A the swimming phenotype of the double mutant is non-additive and the phenotype of *hdmA* dominates upon the phenotype of *hdmB*. This result indicates that both genes act in the same pathway and suggests that *hdmB* acts upstream of *hdmA*. As expected, no biofilm forming phenotype was observed for the double mutant (Fig. 3.3B). Then, we analyzed the swimming motility (Fig. 3.3C) and biofilm formation (Fig. 3.3D) phenotypes on double mutants affected in *hdm* genes plus either *sadB* or *gacA*. In the case of swimming motility, the phenotypes of the double mutants affecting *sadB* were not conclusive since it is not possible to distinguish between an additive or a non-additive phenotype. However, in the case of the double mutants affected in *gacA* a non-additive phenotype was observed, with *hdmA* suppressing the phenotype of *gacA* and *gacA* suppressing the phenotype of *hdmB*. Regarding the biofilm forming phenotype (Fig. 3.3B), although neither *hdmA* or *hdmB* have a biofilm forming phenotype, mutations in either gene were able to suppress the biofilm forming phenotypes of the *sadB* and *gacA* mutations, indicating that the *hdm* genes act downstream *sadB* and *gacA* (Fig 3.3D).

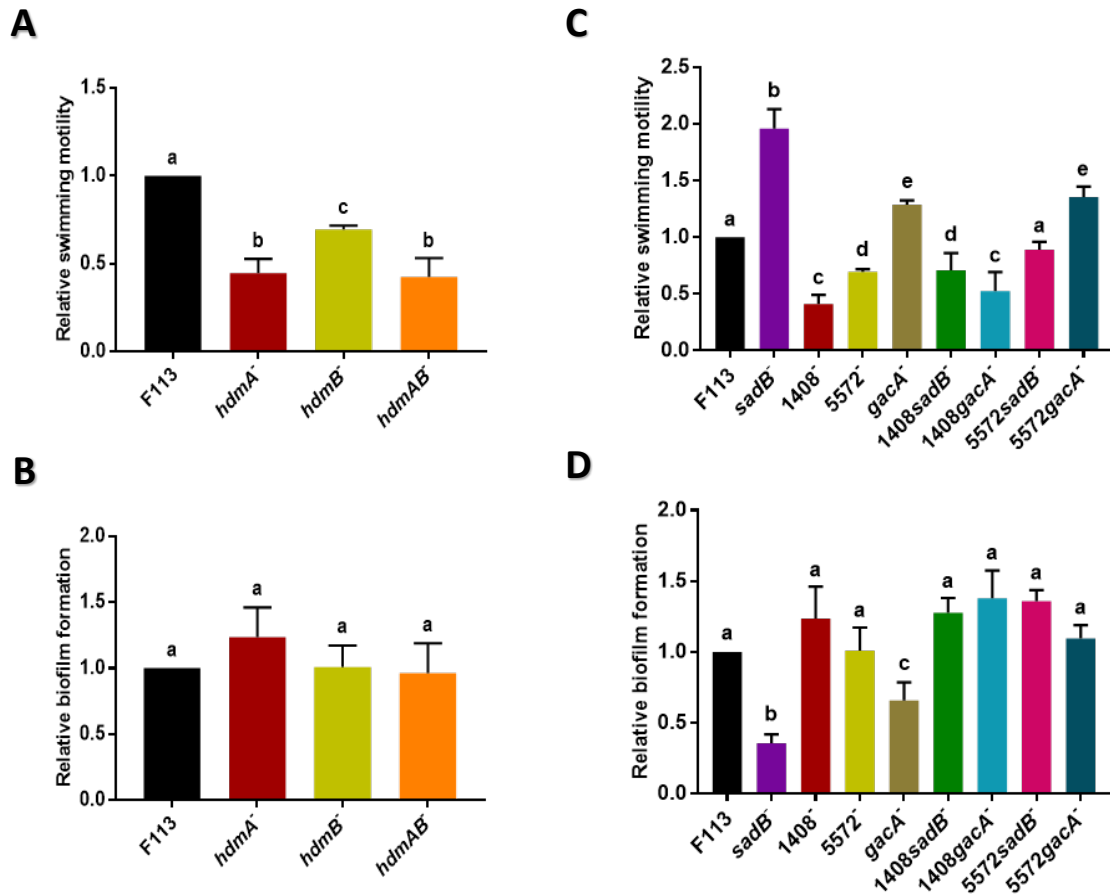


Figure 3.3: *hdmA* and *hdmB* participate in the same regulatory pathway than *sadB* and *gacA*. (A) Relative swimming motility and (B) relative biofilms formation of *P. fluorescens* F113 and derivative simple and double mutants in *hdmA* and *hdmB* genes. (C) Relative swimming motility and (D) relative biofilms formation of all the double mutants tested. Averages of at least three triplicated assays plus standard deviation is shown. Different letters indicate significant different ($p < 0.05$).

HdmA and HdmB might bind c-di-GMP

The HDOD domain resembles the PDE HD-GYP domain. However, the HDOD domain does not possess catalytic activity and it has been suggested that it might bind c-di-GMP (Merritt *et al.*, 2007). Furthermore, Trampari (2016) has shown that, in *P. fluorescens* F113, SadB protein specifically binds this cyclic nucleotide. Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis of SadB in the presence of c-di-GMP showed that the protein was able to bind the cyclic nucleotide with a dissociation constant (K_d) of 0.23 μ M (Fig. 3.4.A). Figure 3.4.B shows that this binding is specific, since SUPr assay with bound c-di-GMP is inhibited by free c-di-GMP but not by GTP. Gel chromatography analysis (not shown) showed that SadB is a dimer independently of the presence of c-di-GMP.

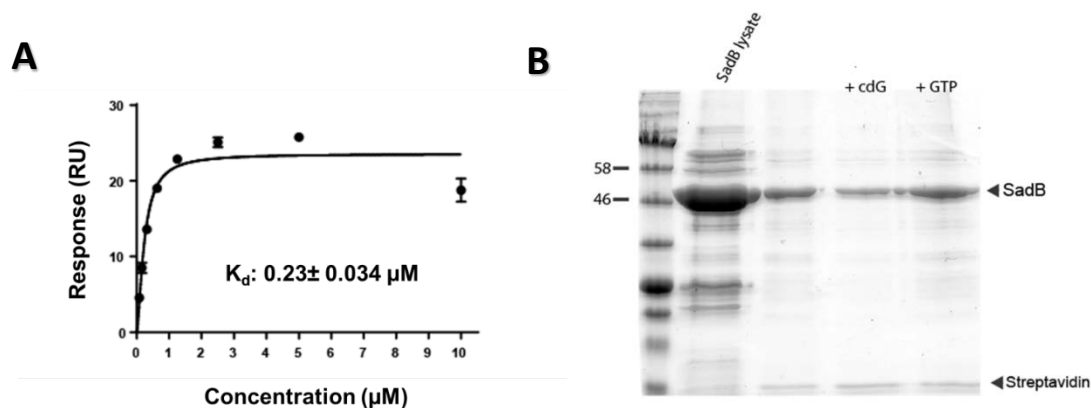


Figure 3.4: SadB c-di-GMP binding assays. (A) SPR affinity fit describing SadB-c-di-GMP binding. **(B)** Streptavidin UV Precipitation (SUPr) assay. Biotinylated c-di-GMP was used for the isolation of SadB from a complex mix of proteins. Non-induced lysate was used as reference. Modified of (Trampari, 2016).

Since HdmA and HdmB possess an HDOD domain similar to SadB, we decided to test c-di-GMP binding to purified HdmA and HdmB protein. SPR analysis (Figs. 3.5A and 3.6A) gave inconclusive results, although K_d could be calculated for both proteins at 2.7 and 2.2 μ M, respectively, the binding kinetics did not show saturation. Furthermore, both DRaCALA (Figs. 3.5B and 3.6B) and SUPr experiments (Figs. 3.5C and 3.6C) gave intermediate results. Therefore, although it is possible that HdmA and HdmB bind c-di-GMP at physiological concentrations, more experiments, such as Isothermal titration calorimetry (ITC), are necessary in order to confirm it.

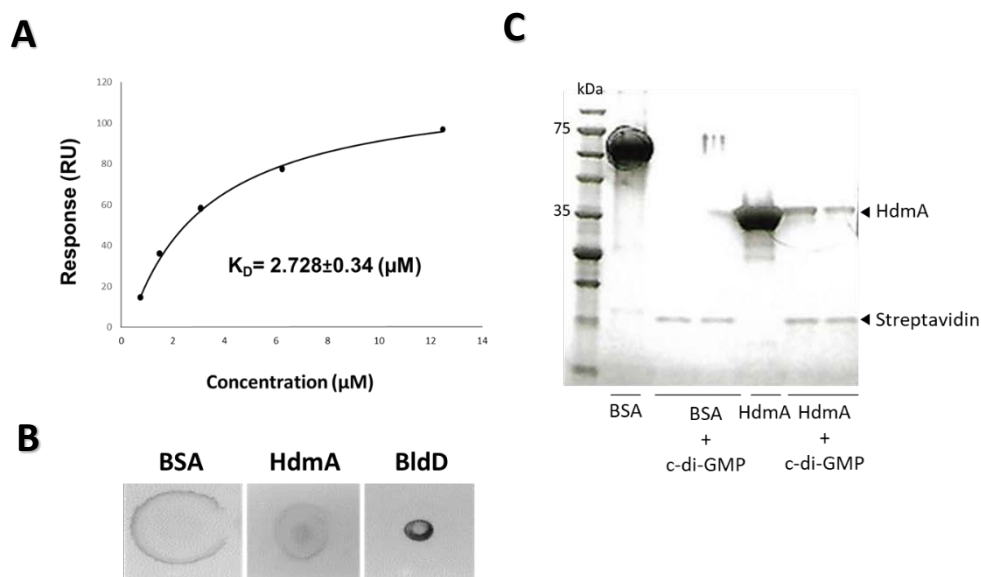


Figure 3.5: HdmA c-di-GMP binding assays. (A) SPR affinity fit describing HdmA-c-di-GMP binding. (B) DRAcALA assay using 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. BSA was used as negative control and BldD as positive control. (C) Streptavidin UV Precipitation (SUPr) assay. Biotinylated c-di-GMP was used for the isolation of HdmA from a complex mix of proteins. No c-di-GMP bind BSA protein was used as reference.

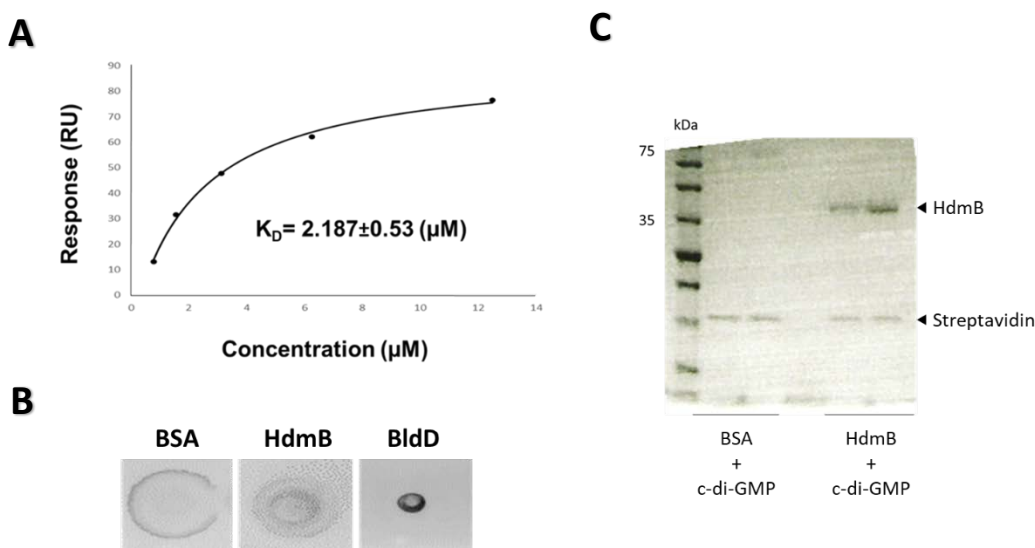


Figure 3.6: HdmB c-di-GMP binding assays. (A) SPR affinity fit describing HdmA-c-di-GMP binding. (B) DRAcALA assay using 2'-Fluo-AHC-c-di-GMP. BSA was used as negative control and BldD as positive control. (C) Streptavidin UV Precipitation (SUPr) assay. Biotinylated c-di-GMP was used for the isolation of HdmB from a complex mix of proteins. No c-di-GMP bind BSA protein was used as reference.

Discussion

Biogenesis of the flagellar apparatus in pseudomonads is activated by the master regulator FleQ, which initiates a regulatory cascade (Arora *et al.*, 1997). In *Pseudomonas fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2012) and in *P. aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014), the expression of the *fleQ* gene is transcriptionally repressed by AmrZ, a bifunctional regulator, whose expression depends on the sigma factor AlgU (Tart *et al.*, 2006). In *P. fluorescens* F113, expression of *algU* is under the control of two convergent pathways: the Gac/Rsm pathway and the SadB pathway (Martinez-Granero *et al.*, 2012).

The implication of c-di-GMP in the regulation of flagellar synthesis is evident at different levels. First, it has been shown that FleQ is a c-di-GMP binding protein (Hickman & Harwood, 2008) that in response to this cyclic nucleotide functions either as a transcriptional activator or as a repressor (Baraquet *et al.*, 2012). Thus, high levels of c-di-GMP repress flagella synthesis through FleQ (Baraquet & Harwood, 2013), activating in turn genes for the production of exopolysaccharides implicated in biofilm formation (Baraquet *et al.*, 2012). The protein SadB, other of the regulators implicated in the regulation of flagella synthesis, has been shown to specifically bind c-di-GMP at physiological levels (Trampari, 2016). However, it is not yet known the implication of c-di-GMP in the functioning of SadB. Furthermore, other of the regulatory proteins, AmrZ, has been shown to be a major determinant of c-di-GMP levels in *P. fluorescens* F113. In this bacterium, AmrZ acts as a transcriptional activator of genes encoding diguanylate cyclases (DGCs) and other proteins related with c-di-GMP turnover (Muriel *et al.*, 2018). Two of these DGCs: GcbA and AdrA are implicated in motility, since mutation of the genes encoding them, results in a hypermotility phenotype (Muriel *et al.*, 2018).

Here we show that, at least these two DGCs and two novel HDOD domains proteins, which might bind c-di-GMP, participate in the regulatory pathway resulting in flagella biogenesis. GcbA was originally identified as a protein related to swimming motility regulation in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (Newell *et al.*, 2009). Besides, in *P. aeruginosa*, GcbA functions to modulate an intracellular pool of c-di-GMP to suppress flagellar reversal rates and to promote permanent cell-surface interactions in a manner independent of the expression of EPS-biosynthetic genes (Petrova *et al.*, 2014). GcbA is conserved in a variety

of pseudomonads. In particular, protein sequence homology between PSF113_0661 is 94% identity with *P. fluorescens* Pf0-1 *gcbA* (Pfl01_0623) and 75% identity with *gcbA* of *P. aeruginosa* PAO1 (PA4843). In *P. fluorescens* F113, inactivation of the *gcbA* gene resulted in a significant increase in swimming motility but not significant change in initial stages of attachment to surfaces (Muriel *et al.*, 2018). Results presented here show that *gcbA* is epistatic over *sadB*, indicating genetic interaction between the two genes. Since *gcbA* mutation suppresses the motility and biofilm formation phenotypes of the *sadB* mutant, it is likely that GcbA acts downstream SadB in the signaling pathway leading to flagella biogenesis. These results do not preclude that GcbA might also participate in flagella rotation through a SadB independent pathway, as is the case in strain Pf0-1.

PSF113_1982 encodes a transmembrane protein with a conserved C-terminal GGDEF cytoplasmatic domain and an N-terminal MASE2 integral membrane sensory domain with unknown function but often found adjacent to GGDEF domains in bacterial signaling proteins (Nikolskaya *et al.*, 2003) (Fig. 3.1B). A BlastP search identified the protein encoded by PSF113_1982 as the conserved diguanylate cyclase AdrA from the *Pseudomonas fluorescens* group. Besides this group, orthologues of this gene are present in the genomes of *P. syringae*, *P. putida* and *P. stutzeri* but it is absent in *P. aeruginosa*. To our knowledge, its implication in swimming motility and/or biofilm formation has not been explored in other strains different from *P. fluorescens* F113. PSF113_1982 presents limited homology but identical architecture with the AdrA protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Simm *et al.*, 2004) and the YaiC protein of *Escherichia coli* (Römling *et al.*, 2000), implicated in c-di-GMP mediated biofilm formation (Cowles *et al.*, 2015). Previous analysis showed that in *P. fluorescens* F113, AdrA is involved in swimming and biofilms formation, since inactivation of the *adrA* gene resulted in increased swimming motility and a reduction in the initial stages of attachment to surfaces (Muriel *et al.*, 2018). Furthermore, to confirm that AdrA acts as a DGC we carried out the overexpression of this gene in *E. coli* DH5 α , resulting in a substantial decrease in swimming motility comparable to the effect described for the DGC SadC (Supplementary Fig. 3.3A) (Martinez-Granero *et al.*, 2014a). The results presented here also show genetic interaction between *adrA* and *sadB* indicating that, likewise GcbA, AdrA participates in the regulation of flagella biogenesis. However, in the case of *adrA*, the *sadB* mutation is dominant, suggesting that AdrA acts upstream of SadB. Since AdrA is a predicted membrane protein with a putative sensory domain, this protein links SadB

signaling with possible environmental signals. Therefore, in the regulatory cascade, it seems that AdrA acts upstream of SadB and this protein upstream of GcbA. It is not clear why these two proteins have different effects on biofilm formation, while they have similar effects on motility. Significantly, overexpression of *gcbA* or *adrA* genes in *P. fluorescens* F113 resulted in a small, but significant decrease of swimming motility (Supplementary Fig. 3.3B) while only the overexpression of *adrA* produced a significant increment in biofilm formation (Supplementary Fig. 3.3C), confirming their specific roles in both processes.

The SadB protein is characterized by the presence of a HDOD domain. A search in the *P. fluorescens* F113 genome found another two small proteins that contained HDOD domains. Besides the HDOD domain, the SadB protein also contains an YbaK like domain. Although the function of this domain, which resembles active sites of deacylases, is unknown, it seems to be important for its function, since insertions in both domains abolish SadB function in *P. aeruginosa* (Caiazza & O'Toole, 2004). Conversely, the other two HDOD proteins do not contain any other recognizable domain and the HDOD domain expand through most of the protein sequence. Mutation in the genes encoding either of these two proteins resulted in a motility phenotype and for this reason we called them HdmA and HdmB. The phenotype of *hdmA* and *hdmB* mutants is opposite to the phenotype of the *sadB* mutant. SadB has been described as a signal transduction protein (Caiazza *et al.*, 2005) that negatively regulates motility (Navazo *et al.*, 2009). Similarly, HdmA and HdmB should be considered signal transduction proteins that activate motility. Interestingly, both genes are widely conserved among pseudomonads, both in sequence and in genetic context. The gene encoding HdmA is located in the vicinity of the *algU* gene and *hdmB* is located just upstream of *mutM* in a number of species, including *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* (group), *P. putida*, *P. syringae* and *P. stutzeri*. Despite this conservation, to our knowledge, the function of these proteins has not been studied before. The results presented here show that HdmA directly participates in the biosynthesis of the flagellar apparatus, since a null mutant presents a severe defect in the transcription of the *fliC* gene, which encodes flagellin, the structural protein in the flagellar filament. In the case of HdmB, it is unclear how it affects motility, since its mutant does not have any effect in the transcription of this gene. However, its epistatic relation with *hdmA*, *sadB*, and *gacA* genes, suggests that together with these genes, *hdmB* participates in the regulation of flagellar biogenesis. The epistatic relations between these genes suggest that *hdmB* acts upstream of *hdmA* and that both *gacA* and

sadB act upstream of the *hdm* genes. Surprisingly, in the case of *hdmB*, it seems to act upstream of *gacA* for motility and downstream of *gacA* for biofilm formation. It is possible that other effects of the *hdmB* gene, for instance in flagellar rotation are affecting differentially both phenotypes.

Proteins harboring the HDOD domain are present in a large variety of bacterial species. This domain is usually found associated with a REC domain in response regulators, but it is also found standing alone (Galperin, 2006), as it is the case in HdmA and HdmB. This domain resembles the HD-GYP domain but lacks its characteristic c-di-GMP phosphodiesterase activity (Galperin, 2004). Proteins with HDOD domain have not been previously studied in pseudomonads, but two of them have been studied in *Xanthomonas campestris*. The HdpA protein from this bacterium has been shown to be implicated in bacterial attachment (Lee *et al.*, 2016), while the GsmR protein has been confirmed to affect the transcription of genes implicated in flagellar synthesis, including the *fliC* gene (Liu *et al.*, 2013). It is therefore likely that HDOD proteins play similar roles in *X. campestris* and *P. fluorescens*. However, the biochemical role (s) of HDOD domain has not been established. The similarity of the HDOD domain with the HD-GYP domain and its lack of phosphodiesterase activity prompted to Merritt and coworkers and Navazo and coworkers (Merritt *et al.*, 2007, Navazo *et al.*, 2009) to suggest that the HDOD domain in SadB could bind c-di-GMP. It has indeed been shown (Trampari, 2016) that the SadB protein from *P. fluorescens* F113 is able to act as a dimer to bind c-di-GMP specifically. Therefore, we decided to test whether HdmA and HdmB were also able to bind this cyclic nucleotide. However, we obtained inconclusive results that do not discard, but do not confirm binding of c-di-GMP. Therefore, alternative methods to determine the binding are required.

Previous results showing the regulatory pathways determining flagella biosynthesis in *P. fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2012) and the results presented here, allow to extend our knowledge about the implication of c-di-GMP in *P. fluorescens*. According to our previous results, at least two c-di-GMP binding proteins, SadB and FleQ, participate in this regulation. Now, we add two new proteins, HdmA and HdmB that might bind c-di-GMP through their HDOD domain. Since these two proteins appear to act downstream GacA and SadB and have a putative K_d for c-di-GMP at the same concentration range of FleQ (Chou & Galperin, 2016), it is likely that they act at this level, especially since HdmA strongly

influences the transcription of the FleQ activated gene *fliC*. We also show that at least two of the DGCs activated by AmrZ (Muriel *et al.*, 2018) are implicated in the synthesis of flagella. One of them, AdrA acts upstream of SadB and it is therefore likely that c-di-GMP produced by AdrA is sensed by SadB. The other DGC, GcbA acts downstream of SadB and the c-di-GMP produced by this DGC might be sensed by FleQ or by the Hdm proteins. Since GcbA is acting downstream of SadB it is possible that c-di-GMP produced at this level might be acting on flagella rotation, since c-di-GMP binding proteins such as Flil (Trampari *et al.*, 2015) and FlgZ (Martinez-Granero *et al.*, 2014a) have been defined in this process.

References

- Aarons S**, Abbas A, Adams C, Fenton A & O'Gara F (2000) A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of bacteriology* **182**: 3913-3919.
- Aravind L & Koonin EV** (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in biochemical sciences* **23**: 469-472.
- Arora SK**, Ritchings BW, Almira EC, Lory S & Ramphal R (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *Journal of bacteriology* **179**: 5574-5581.
- Ausmees N**, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M & Lindberg M (2001) Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS microbiology letters* **204**: 163-167.
- Baker AE**, Diepold A, Kuchma SL, Scott JE, Ha DG, Orazi G, Armitage JP & O'Toole GA (2016) PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **198**: 1837-1846.
- Barahona E**, Navazo A, Yousef-Coronado F, Aguirre de Carcer D, Martinez-Granero F, Espinosa-Urgel M, Martin M & Rivilla R (2010) Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environmental microbiology* **12**: 3185-3195.
- Baraquet C**, Murakami K, Parsek MR & Harwood CS (2012) The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic acids research* **40**: 7207-7218.
- Baraquet C & Harwood CS** (2013) Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 18478-18483.
- Bertani G** (1951) A Method for Detection of Mutations, Using Streptomycin Dependence in *Escherichia coli*. *Genetics* **36**: 598-611.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.
- Caiazza NC & O'Toole GA** (2004) SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* **186**: 4476-4485.
- Caiazza NC**, Shanks RM & O'Toole GA (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **187**: 7351-7361.
- Capdevila S**, Martinez-Granero FM, Sanchez-Contreras M, Rivilla R & Martin M (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889-3897.
- Cowles KN**, Willis DK, Engel TN, Jones JB & Barak JD (2015) Diguanylate Cyclases AdrA and STM1987 Regulate *Salmonella enterica* Exopolysaccharide Production during Plant Colonization in an Environment-Dependent Manner. *Applied and environmental microbiology* **82**: 1237-1248.
- Chou SH & Galperin MY** (2016) Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *Journal of bacteriology* **198**: 32-46.
- Dasgupta N**, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S & Ramphal R (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **50**: 809-824.
- de Weert S**, Vermeiren H, Mulders IH, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R & Lugtenberg BJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **15**: 1173-1180.
- Deflaun MF**, Marshall BM, Kulle EP & Levy SB (1994) Tn5 Insertion Mutants of *Pseudomonas fluorescens* Defective in Adhesion to Soil and Seeds. *Applied and environmental microbiology* **60**: 2637-2642.
- Galperin MY** (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental microbiology* **6**: 552-567.
- Galperin MY** (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of bacteriology* **188**: 4169-4182.

- Heeb S**, Blumer C & Haas D (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology* **184**: 1046-1056.
- Hengge R** (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews Microbiology* **7**: 263-273.
- Hickman JW & Harwood CS** (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular microbiology* **69**: 376-389.
- Jones CJ**, Newsom D, Kelly B, *et al.* (2014) ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **10**: e1003984.
- Kirchner O & Tauch A** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of biotechnology* **104**: 287-299.
- Kovach ME**, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Lee HM**, Liao CT, Chiang YC, Chang YY, Yeh YT, Du SC & Hsiao YM (2016) Characterization of genes encoding proteins containing HD-related output domain in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Antonie van Leeuwenhoek* **109**: 509-522.
- Little R**, Salinas P, Slavny P, Clarke TA & Dixon R (2011) Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission. *Molecular microbiology* **82**: 222-235.
- Liu YF**, Liao CT, Song WL, Hsu PC, Du SC, Lo HH & Hsiao YM (2013) GsmR, a response regulator with an HD-related output domain in *Xanthomonas campestris*, is positively controlled by Clp and is involved in the expression of genes responsible for flagellum synthesis. *The FEBS journal* **280**: 199-213.
- Livak KJ & Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Martinez-Granero F**, Rivilla R & Martin M (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Applied and environmental microbiology* **72**: 3429-3434.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PloS one* **7**: e31765.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Gonzalez de Heredia E, Baena I, Martin-Martin I, Rivilla R & Martin M (2014a) Identification of *flgZ* as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PloS one* **9**: e87608.
- Martinez-Granero F**, Redondo-Nieto M, Vesga P, Martin M & Rivilla R (2014b) AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P. fluorescens* F113. *BMC genomics* **15**: 237.
- Merritt JH**, Brothers KM, Kuchma SL & O'Toole GA (2007) SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of bacteriology* **189**: 8154-8164.
- Muriel C**, Jalvo B, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2015) Chemotactic Motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. *PloS one* **10**: e0132242.
- Muriel C**, Arrebola E, Redondo-Nieto M, *et al.* (2018) AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Scientific reports* **8**: 1979.
- Navazo A**, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martinez-Granero F, Rivilla R & Martin M (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial biotechnology* **2**: 489-498.
- Nesper J**, Reinders A, Glatter T, Schmidt A & Jenal U (2012) A novel capture compound for the identification and analysis of cyclic di-GMP binding proteins. *Journal of proteomics* **75**: 4874-4878.
- Newell PD**, Monds RD & O'Toole GA (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 3461-3466.
- Nikolskaya AN**, Mulikidjanian AY, Beech IB & Galperin MY (2003) MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **5**: 11-16.
- O'Toole GA & Kolter R** (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* **28**: 449-461.

- Peeters E**, Nelis HJ & Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods* **72**: 157-165.
- Petrova OE**, Cherny KE & Sauer K (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclase GcbA, a homolog of *P. fluorescens* GcbA, promotes initial attachment to surfaces, but not biofilm formation, via regulation of motility. *Journal of bacteriology* **196**: 2827-2841.
- Roelofs KG**, Wang J, Sintim HO & Lee VT (2011) Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein-metabolite interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 15528-15533.
- Römling U**, Rohde M, Olsen A, Normark S & Reinkoster J (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular microbiology* **36**: 10-23.
- Scher FM & Baker R** (1982) Effects of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* **72**: 1567-1573.
- Schäfer A**, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Shanahan P**, O'Sullivan D J, Simpson P, Glennon JD & O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and environmental microbiology* **58**: 353-358.
- Simm R**, Morr M, Kader A, Nimtz M & Römling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular microbiology* **53**: 1123-1134.
- Stevenson CE**, Assaad A, Chandra G, Le TB, Greive SJ, Bibb MJ & Lawson DM (2013) Investigation of DNA sequence recognition by a streptomycete MarR family transcriptional regulator through surface plasmon resonance and X-ray crystallography. *Nucleic acids research* **41**: 7009-7022.
- Tal R**, Wong HC, Calhoun R, *et al.* (1998) Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of bacteriology* **180**: 4416-4425.
- Tart AH**, Blanks MJ & Wozniak DJ (2006) The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Journal of bacteriology* **188**: 6483-6489.
- Trampari E**, Stevenson CE, Little RH, Wilhelm T, Lawson DM & Malone JG (2015) Bacterial rotary export ATPases are allosterically regulated by the nucleotide second messenger cyclic-di-GMP. *The Journal of biological chemistry* **290**: 24470-24483.
- Trampari E** (2016) Allosteric control of type III secretion systems by the second messenger c-di-GMP. Department of Molecular Microbiology, John Innes Center. University of East Anglia. Norwich, UK.
- Tschoewri N**, Schumacher MA, Schlimpert S, Chinnam NB, Findlay KC, Brennan RG & Buttner MJ (2014) Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development. *Cell* **158**: 1136-1147.
- Wilson KJ**, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans AD & Jefferson RA (1995) beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology* **141** (Pt 7): 1691-1705.

Supplementary

Supplementary

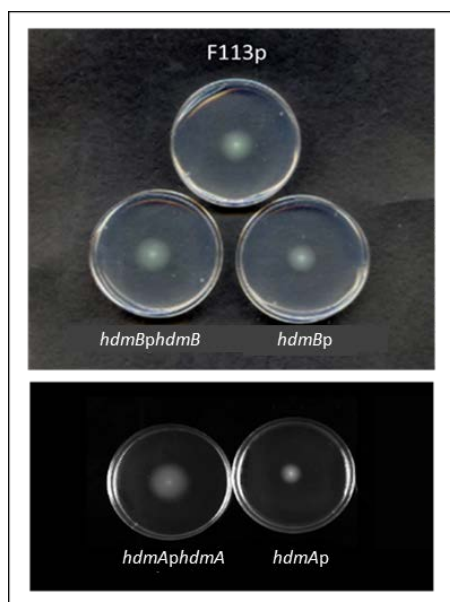


Figure S3.1: *hdmB* and *hdmA* gene complementation. Swimming motility of *P. fluorescens* F113 and derivative strains harboring the empty vector pME6032 (*P. fluorescens* F113: F113p; *hdmB* mutant: *hdmBp*; *hdmA* mutant: *hdmAp*) and both mutants overexpress gene to restore wt phenotype (*hdmB*⁻ harboring *hdmB* gene: *hdmBp hdmB*; *hdmA*⁻ overexpress *hdmA* gene: *hdmAp hdmA*). Exponentially growing cells were inoculated with a toothpick on SA plates containing 0.3% purified agar. Haloes were observed 48 hours after

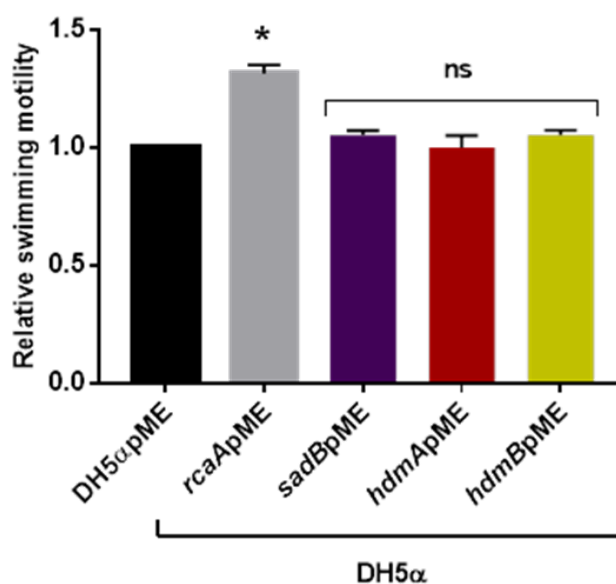


Figure S3.2. Relative swimming motility of *E. coli* DH5α harboring overexpression pME6032 vector. In order to discard the PDE activity *P. fluorescens* SBW25 PDE (*rcaA*) as well as *P. fluorescens* F113 HD genes (*sadB*, *hdmA* and *hdmB*) were introduced into *E. coli* DH5α testing their motility. Averages of three triplicated experiments plus standard deviation are shown. Asterisk indicate significance differences ($p < 0.05$).

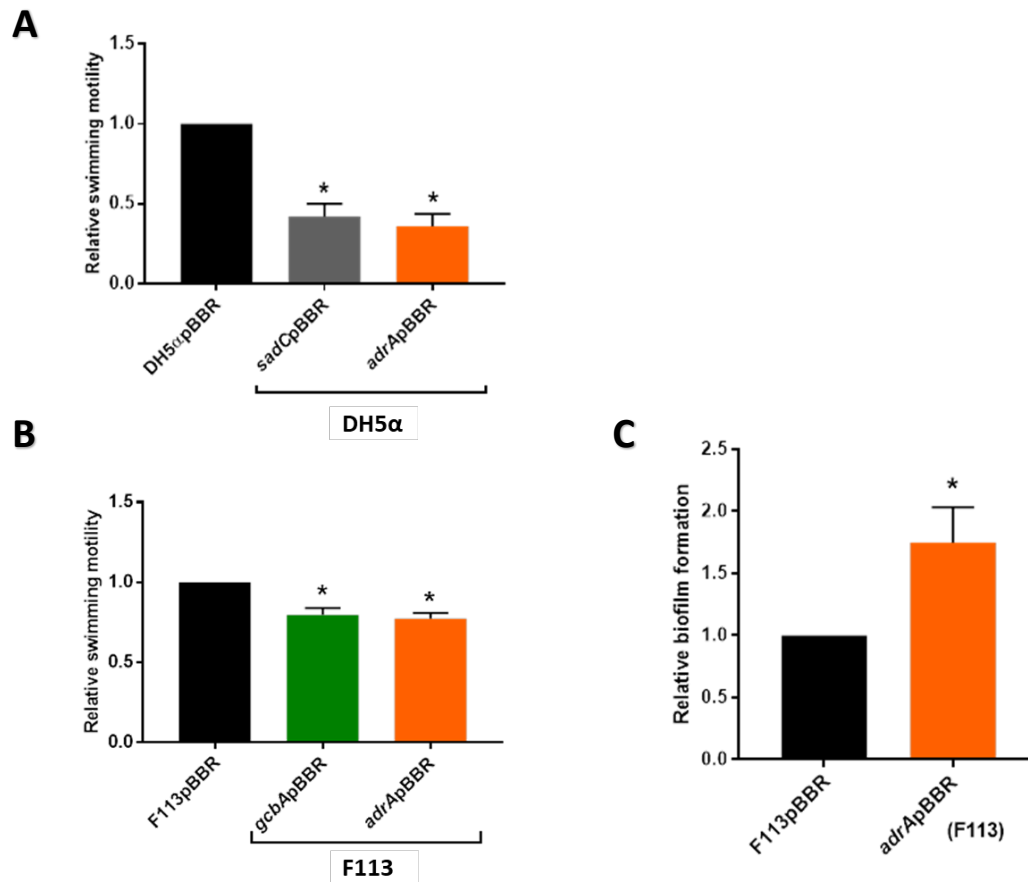


Figure S3.3: GcbA and AdrA appears to act as DGCs. (A) Relative swimming motility of *P. fluorescens* F113 *SadC* and *adrA* genes, encode to putative DGCs in *E. coli* DH5α background. **(B)** Relative swimming motility of *P. fluorescens* F113 derivatives harboring vectors which overexpress *gcbA* and *adrA* gene. **(C)** Relative biofilms formation of *P. fluorescens* F113 overexpress *adrA* gene. Every gene were cloned in the overexpression pBBRMCS-5 vector and wt strains harboring the empty plasmid were used as control. Averages of three triplicated experiments and standard deviation are shown. Asterisk indicate statistically significant differences ($p > 0.05$).

Strains	Description	Reference
<i>P. fluorescens</i>		
F113	<i>P. fluorescens</i> F113 wild type, Rif ^R	(Shanahan <i>et al.</i> , 1992)
<i>gcbA</i> ⁻	F1130661 Rif ^R Km ^R	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
<i>adrA</i> ⁻	F1131982 ⁻ , Rif ^R Km ^R	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
<i>hdmA</i> ⁻	F1131408 ⁻ , Rif ^R Spc ^R	This work
<i>hdmB</i> ⁻	F1131982 ⁻ , Rif ^R Km ^R	This work
<i>sadB</i> ⁻	F1135782 ⁻ , Rif ^R Km ^R	(Navazo <i>et al.</i> , 2009)
<i>gacA</i> ⁻	F1133284 ⁻ , Rif ^R Km ^R	(Martínez-Granero <i>et al.</i> , 2006)
<i>gcbAsadB</i> ⁻	F11306615782 ⁻ , Rif ^R Km ^R Gm ^R	This work
<i>adrAsadB</i> ⁻	F11319825782 ⁻ , Rif ^R Km ^R Gm ^R	This work
<i>hdmAB</i> ⁻	F11314085572 ⁻ Rif ^R Spc ^R Gm ^R	This work
<i>hdmAsadB</i> ⁻	F11314085782 ⁻ Rif ^R Spc ^R Km ^R	This work
<i>hdmAgacA</i> ⁻	F11314083284 ⁻ Rif ^R Spc ^R Km ^R	This work
<i>hdmBsadB</i> ⁻	F11355725782 ⁻ Rif ^R Km ^R Gm ^R	This work
<i>hdmBgacA</i> ⁻	F11355723284 ⁻ Rif ^R Km ^R Gm ^R	This work
<i>hdmBgn</i> ⁻	F1135572 ⁻ Rif ^R Gm ^R	This work
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>E. coli</i> cloning strain: $\Phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, <i>U169</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17 (rK,mK+)</i> , <i>phoA</i> , <i>supE44-λ-thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Gibco-BRL
BL21-(DE3)	Sm ^R , K12 <i>recF143 lacIq lacZΔ.M15, xylA</i>	Novagen
Plasmids		
pCR2.1 TOPO	Cloning vector, Km ^R	Life Technologies
pK18mobsacB	Suicide vector for allelic exchange; pUC18 derivative <i>lacZ mob</i> site <i>sacB</i> , Km ^R	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pG18mob2	Suicide vector <i>sacB</i> , Gn ^R	(Kirchner & Tauch, 2003)
pME6032	IPTG inducible expression vector, Tet ^R	(Heeb <i>et al.</i> , 2002)
pBBR1MCS-5	Replicative plasmid with <i>lacZ</i> promoter for overexpression, Gn ^R	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pETNdeM-11	Purification vector, N-terminal His ₆ tag, Km ^R	(Little <i>et al.</i> , 2011)
pCAM140	Vector with miniTN5gus, Spc ^R	(Wilson <i>et al.</i> , 1995)
pBG1804	pCAM140 containing the <i>hdmA</i> gene, Spc ^R	This work
pBG2149	pCR2.1TOPO derivative with <i>hdmB</i> gene, Km ^R	This work
pBG2166	pG18mob2 derivative with <i>hdmB</i> gene, Gm ^R	This work
pBG2126	pETNdeM-11 harboring <i>sadB</i> gene, Km ^R	This work
pBG2155	pETNdeM-11 harboring <i>hdmA</i> gene, Km ^R	This work
pBG2156	pETNdeM-11harboring <i>hdmB</i> gene, Km ^R	This work
pBG2159	pME6032 harboring <i>sadB</i> gene, Tc ^R	This work
pBG2157	pME6032 harboring <i>hdmA</i> gene, Tc ^R	This work
pBG2158	pME6032 harboring <i>hdmB</i> gene, Tc ^R	This work

Table S3.1: Bacterial strains and plasmids used in this study.

References

- Heeb S**, Blumer C & Haas D (2002) Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology* **184**: 1046-1056.
- Kirchner O & Tauch A** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of biotechnology* **104**: 287-299.
- Kovach ME**, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd & Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.
- Little R**, Salinas P, Slavny P, Clarke TA & Dixon R (2011) Substitutions in the redox-sensing PAS domain of the NifL regulatory protein define an inter-subunit pathway for redox signal transmission. *Molecular microbiology* **82**: 222-235.
- Muriel C**, Arrebola E, Redondo-Nieto M, et al. (2018) AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Scientific reports* **8**: 1979.
- Navazo A**, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martinez-Granero F, Rivilla R & Martin M (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial biotechnology* **2**: 489-498.
- Schäfer A**, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Puhler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Shanahan P**, O'Sullivan D J, Simpson P, Glennon JD & O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and environmental microbiology* **58**: 353-358.
- Wilson KJ**, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans AD & Jefferson RA (1995) beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology* **141** (Pt 7): 1691-1705.

Capítulo 4

Chemotactic motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under aerobic and denitrification conditions

Candela Muriel, Blanca Jalvo, Miguel Redondo-Nieto, Rafael Rivilla & Marta Martín.

(2015).*PLoS ONE* **10(7)**: e0132242

Summary

The sequence of the genome of *Pseudomonas fluorescens* F113 has shown the presence of multiple traits relevant for rhizosphere colonization and plant growth promotion. Among these traits are denitrification and chemotactic motility. Besides aerobic growth, F113 is able to grow anaerobically using nitrate and nitrite as final electron acceptors. F113 is able to perform swimming motility under aerobic conditions and under anaerobic conditions when nitrate is used as the electron acceptor. However, nitrite can not support swimming motility. Regulation of swimming motility is similar under aerobic and anaerobic conditions, since mutants that are hypermotile under aerobic conditions, such as *gacS*, *sadB*, *kinB*, *algU* and *wspR*, are also hypermotile under anaerobic conditions. However, chemotactic behavior is different under aerobic and denitrification conditions. Unlike most pseudomonads, the F113 genome encode three complete chemotaxis systems, Che1, Che2 and Che3. Mutations in each of the *cheA* genes of the three Che systems has shown that the three systems are functional and independent. Mutation of the *cheA1* gene completely abolished swimming motility both under aerobic and denitrification conditions. Mutation of the *cheA2* gene, showed only a decrease in swimming motility under both conditions, indicating that this system is not essential for chemotactic motility but is necessary for optimal motility. Mutation of the *cheA3* gene abolished motility under denitrification conditions but only produced a decrease in motility under aerobic conditions. The three Che systems proved to be implicated in competitive rhizosphere colonization, being the *cheA1* mutant the most affected.

Introduction

The *Pseudomonas fluorescens* complex comprises a group of related pseudomonads that are often found saprophytically associated with plants. A large number of strains belonging to this group have been found to colonize the rhizosphere and the endophytic compartments and to positively influence plant growth, either directly through biofertilization or manipulation of the plant hormone balance, or indirectly through biological control of pathogens (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). A series of recent phylogenomic studies (Silby *et al.*, 2009, Loper *et al.*, 2012, Redondo-Nieto *et al.*, 2013) have shown that the *P. fluorescens* complex contains up to five different phylogenetic subgroups and that many traits putatively responsible of the plant growth promoting abilities are phylogenetically distributed. *P. fluorescens* F113 belongs to Subgroup I and is phylogenetically related to strains that have been classified as *P. brassicacearum*. F113 is a plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) that is able to colonize the rhizosphere (Barahona *et al.*, 2010), influencing plant growth directly, by phosphate mobilization (Miller *et al.*, 2010) and degradation of the plant hormone ethylene (Redondo-Nieto *et al.*, 2013), and indirectly by the production of siderophores, fungicides (DAPG) and competition for niche with plant pathogens (Barahona *et al.*, 2011). F113 can colonize the rhizosphere of a wide variety of plants and has been used as a model for rhizosphere colonization (Naseby & Lynch, 2001, Sanchez-Contreras *et al.*, 2002, Martinez-Granero *et al.*, 2005, De La Fuente *et al.*, 2006, Martinez-Granero *et al.*, 2006, von Felten *et al.*, 2011). The full genomic sequence of F113 is available and analysis of the genome has shown the presence of numerous traits that are likely to be involved in its rhizosphere colonization and PGPR abilities (Redondo-Nieto *et al.*, 2013).

Among these traits is denitrification. The F113 genome contains the *nar*, *nir*, *nor* (two sets) and *nos* (two sets) gene clusters, which encode the enzymes required for nitrate, nitrite, nitric oxide and nitrous oxide reduction, respectively (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). The presence of these sets of genes indicates that F113 is likely to oxidize nitrate to dinitrogen. The ability to use nitrate and nitrite under anaerobic conditions as the final electron acceptors has been shown for F113 (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Denitrification has been observed in several pseudomonads species such as *P. aeruginosa* and *P. stutzeri* (Carlson & Ingraham, 1983). However, although denitrification occurs within the *P.*

fluorescens complex (Greenberg & Becker, 1977, Philippot *et al.*, 2001), it seems to be restricted to a limited number of strains which harbor denitrification genes (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Denitrification genes are present in all Subgroup I sequenced strains. It has been shown that there is a positive correlation between denitrification ability and rhizosphere colonization (Ghiglione *et al.*, 2002, Ghirardi *et al.*, 2012).

Another important trait for rhizosphere colonization is chemotactic motility. In several pseudomonads strains, mutants affected either in flagellar genes (Simons *et al.*, 1996, Capdevila *et al.*, 2004) or chemotaxis genes (de Weert *et al.*, 2002) are severely impaired in the competitive colonization of the rhizosphere. In F113, motility is one of the most important traits for rhizosphere colonization since hypermotile mutants affected in regulatory genes show enhanced competitive colonization ability (Barahona *et al.*, 2010) and are selected in the rhizosphere environment (Martinez-Granero *et al.*, 2006). Among these mutations are those affecting flagella synthesis such as mutants in the Gac system, in *algU*, *kinB*, *sadB* and in *amrZ* (Navazo *et al.*, 2009, Barahona *et al.*, 2011, Martinez-Granero *et al.*, 2012, Martinez-Granero *et al.*, 2014a) or affecting flagella rotation such as mutants in *wspR* and in *bifA* (Martinez-Granero *et al.*, 2014b).

The chemotactic apparatus of pseudomonads is encoded by the *che* genes (Ditty *et al.*, 1998, Kato *et al.*, 1999). It consists in a phosphorely in which phosphorylation of CheY by CheA results in the interaction of CheY with the flagellar rotor and changes in flagella rotation. Environmental signaling to CheA is provided by membrane-bound or cytoplasmic methyl acceptor proteins (MCPs). Other proteins such as CheB, CheD, CheV, CheW, CheR and CheZ also participate in the signal transduction process and in resetting the system (Shimizu *et al.*, 2010). Most pseudomonads strains possess one or two sets of the chemotaxis genes (Ferrandez *et al.*, 2002, Redondo-Nieto *et al.*, 2013). However, F113 and *P. brassicacearum* strains such as NFM421 possess three sets of the *che* genes that might conform three distinct and independent chemotaxis apparatus (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). The aim of this work was to investigate motility regulation in *P. fluorescens* F113 under anaerobic denitrification conditions and to determine the functionality of the three chemotactic apparatus and their roles under aerobic and anaerobic conditions. The implication of each of the chemotactic apparatus in competitive rhizosphere colonization was also investigated.

Material and Methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The strains and plasmids used in this study are described in Table S4.1. For growing *P. fluorescens* F113 strains under aerobic conditions we have used either SA medium (Scher & Baker, 1982) or LB medium (Bertani, 1951) with shaking overnight at 28°C. When growing under anaerobic conditions, SA or LB media were supplemented with nitrate (KNO₃) or nitrite (NaNO₂) as the final electron acceptor in airtight tubes that were flushed with argon after inoculation. Growth was monitored by determining optical density of cultures (OD₆₀₀) at different time intervals using a biophotometer (Eppendorf BioPhotometer D30). Anaerobic conditions for growth on solid media were provided by anaerobic jars and systems (Oxoid). *Escherichia coli* strains were grown overnight in Luria-Bertani (LB) medium with shaking at 37°C. Solid growth media contained 1.5% (w/v) agar. The following antibiotics were used, when required, at the indicated concentrations: rifampicin (Rif), 100 µg/mL; ampicillin (Amp), 100 µg/mL; tetracycline (Tet), 10 µg/mL for *E. coli* or 70 µg/mL for *P. fluorescens* F113; kanamycin (Km), 25 µg/mL for *E. coli* or 50 µg/mL for *P. fluorescens* F113; and gentamicin (Gm), 10 µg/mL for *E. coli* or 3 µg/mL for *P. fluorescens* F113 and chloramphenicol 30 µg/mL for *E. coli*. All growth experiments were performed 4 times in triplicate.

Construction of mutants

Insertional mutagenesis has been used to generate mutants by single homologous recombination. Amplified internal fragments from the different genes to be interrupted were cloned into the kanamycin-resistant plasmid pK18*mobsac* (Schäfer *et al.*, 1994) (see S4.2 Table) and introduced into the wild-type F113 strain by triparental mating using pRK600 as the helper plasmid (Finan *et al.*, 1986). Mutants resulting from the single homologous recombination were checked by Southern blotting using probes from the interrupted genes, and by PCR using primers designed from the genes and the pK18*mobsac* plasmid sequences. Mutant complementation analysis was done by isolating cosmids containing the genes from the F113 gene bank of F113. The selected cosmids were introduced in the corresponding mutant by triparental mating using pRK600 as the helper plasmid.

Motility assays

Swimming motility was tested on SA and LB medium with 0.3% (w/v) of purified agar. The same media supplemented with 20 mM nitrate (KNO_3) and 10 mM (NaNO_2) nitrite were used to test swimming under anaerobic conditions. Plates were inoculated with bacteria from an overnight culture using a sterile toothpick and incubated at 28°C. Swimming haloes were measured after 18 and 24 h of inoculation under aerobic conditions, and after 48 and 72 h of inoculation under anaerobic conditions. Every assay was done in triplicate at least three times.

Rhizosphere competitive colonization assays

A root-tip assay test (Barahona *et al.*, 2010) was used. Alfalfa seeds (*Medicago sativa* var. Resis) were sterilized in 70% ethanol for 2 min and in diluted bleach (1:5 v/v) for 15 min and rinsed thoroughly with sterile distilled water. Seeds were germinated at 4°C for 16 h followed by incubation in darkness at 28°C for 24 hours. Germinated alfalfa seeds were sown in Leonard jar gnotobiotic systems using Perlite as solid substrate and 8 mM KNO_3 supplemented FP (Fahraeus, 1957) as the mineral solution. After 2 days, alfalfa seedlings were inoculated with ~10⁸ cells of the appropriate strains (10⁸ cells/ml = 0.0138 optical density at 600 nm). For the competitive colonization assays, the tested strain and the competitor were inoculated at a 1:1 ratio. Plants were maintained for 2 weeks in controlled conditions (16 h of light at 25°C and 8 h of dark at 18°C). Bacteria were recovered from the root tip (last centimeter of the main root) by vortexing for 2 min in 5 ml of SA and appropriate dilutions were plated in SA supplemented with selective antibiotics and after 48 hours of incubation at 28°C, colonies were counted. Colonization assays were done three times in triplicate with 20 plants per replica.

Statistical analysis

SPSS17.0 software (IBM) or Sigma Plot 12.0 software (Microsoft) was used for statistical analysis. The data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test ($p < 0.05$).

Results

Growth and motility of *P. fluorescens* F113 under denitrification conditions.

Growth of F113 was tested using nitrate and nitrite as final electron acceptors under anaerobic conditions in two different media: LB and SA. In order to estimate optimal concentration of electron acceptors, both media were supplemented with increasing concentrations of nitrate and nitrite. Under anaerobic conditions F113 was unable to grow in the absence of nitrate or nitrite in both media. 40 mM nitrate and 10 mM nitrite yielded maximum cell density in both media (Table 4.1).

Growth with NO_3^- as electron acceptor			Growth with NO_2^- as electron acceptor		
KNO_3	SA	LB	NaNO_2	SA	LB
0	<0.01	<0.03	0	<0.01	<0.03
20mM	0.055	0.243	5mM	0.030	0.138
40mM	0.095	0.733	10mM	0.074	0.388
60mM	0.070	0.654	15mM	0.042	0.219
80mM	0.062	0.448	20mM	0.049	0.316
100mM	0.061	0.300	25mM	0.035	0.305

Table 4.1: Yield (max OD_{600}) of *P. fluorescens* F113 growth under anaerobic conditions in the presence of different concentrations of final electron acceptors (nitrate and nitrite) in SA and LB media.

These concentrations were used for subsequent growth experiments. It is interesting to note that opposed to growth under aerobic conditions, the siderophore pyoverdine was not produced in the iron limited medium SA under denitrification conditions. As shown in Fig. 4.1A, growth rate and yield on nitrate were higher in LB medium than in SA medium. On nitrite, growth was very poor in SA medium. Therefore, LB was used for subsequent growth experiments. Fig. 4.1B shows the growth of F113 using either of the three electron acceptors. Growth under aerobic conditions showed higher growth rate and yield. Under anaerobic conditions, no differences were observed on the growth rate when using nitrate or nitrite. However, yield was higher when nitrate was the final electron acceptor.

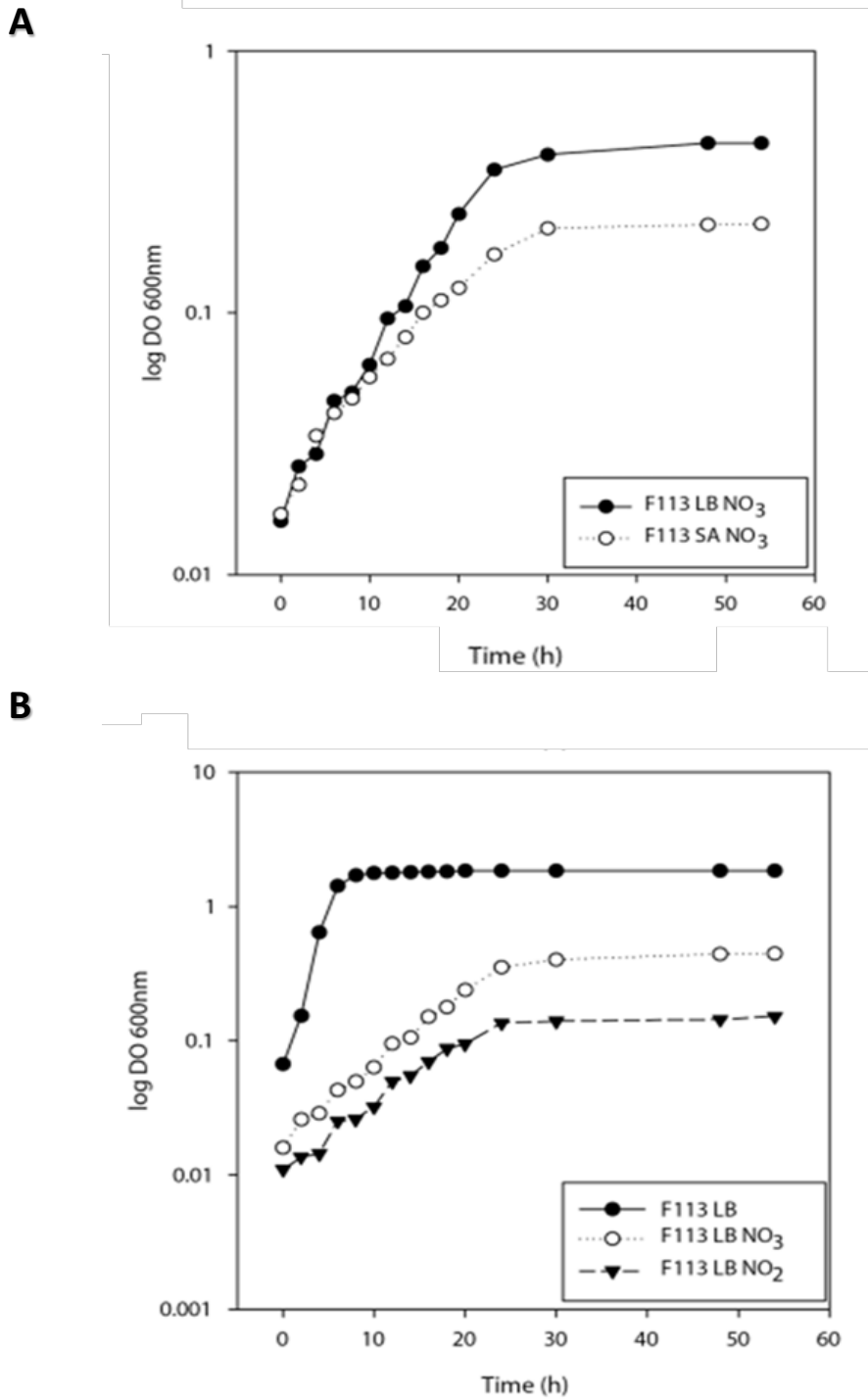


Figure 4.1: Growth of *P. fluorescens* F113 under desnitrification conditions. Growth curves of F113 with different final electron acceptors. Nitrate concentration was 40mM, nitrite concentration was 10 mM. Anaerobic conditions were obtained by flushing inoculated medium with argón. For anaerobic conditions, airtight tubes were used. F113 was unable to grow anaerobically in LB or SA media without nitrate or nitrite. Experiments were done in triplicate. **(A)** Growth curves of F113 in LB and SA media supplemented with nitrate. **(B)** Growth curves of F113 in LB medium (aerobic), LB supplemented with nitrate and LB supplemented with nitrite.

We also tested swimming motility under denitrification conditions. It was observed that F113 was able to move in SA and LB plates supplemented with nitrate but was non-motile with nitrite. Motility was higher in SA medium than in LB medium. Therefore, SA was used in subsequent motility experiments. When F113 swims under nitrate respiring conditions no pyoverdine production was observed in SA plates, conversely to swimming in this medium under aerobic conditions. In order to test whether the lack of motility under nitrite respiring conditions were due to lack of flagella production, cells grown in SA + nitrite were observed by electron and optic microscopy and they showed normal flagellation (Fig. S4.1). Furthermore, when these cells were transferred to an aerobic atmosphere, motility was restored immediately, as judged by phase-contrast microscopy, indicating that the lack of motility was probably due to shortage of energy under nitrite conditions.

Motility regulation under denitrification conditions

Under aerobic conditions, swimming motility is regulated at the levels of flagella synthesis and flagella rotation (Navazo *et al.*, 2009, Martinez-Granero *et al.*, 2014a). In order to test whether this regulation also exists under denitrification conditions, the swimming motility of several hypermotile mutants affected in either pathways was tested in SA + nitrate plates under anaerobic conditions. As shown in Fig. 4.2, the *gacS*, *sadB*, *kinB* and *algU* mutants showed a swimming behavior similar to their hypermotile phenotype under aerobic conditions. These mutants are affected in flagella synthesis. Similarly, a *wspR* mutant that is hypermotile under aerobic conditions, is also hypermotile under anaerobic, denitrification conditions. The *wspR* gene encodes a diguanylate cyclase probably involved in the regulation of flagella rotation and is not implicated in the regulation of flagella synthesis (Martinez-Granero *et al.*, 2014a). These results indicate that swimming motility regulation is very similar, if not identical under aerobic and denitrification conditions.

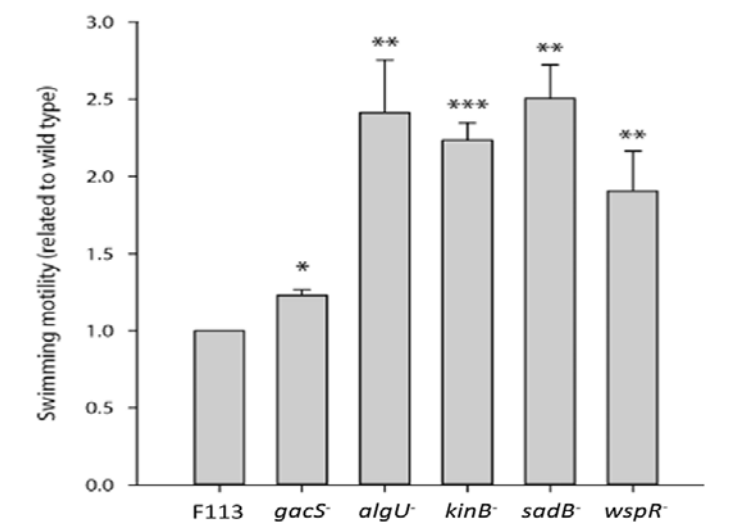


Figure 4.2: Motility regulation under desnitrification conditions. Swimming motility phenotype of *P. fluorescens* F113 and isogenic mutants affected in motility. Experiments were done on SA (0.3% agar) under anaerobic conditions. Haloes were measured 48h after inoculation. Experiments were performed three times in triplicate. Statistically significant results are shown as: *($p < 0.1$), **($p < 0.05$), ***($p < 0.01$).

P. fluorescens F113 possesses three independent and functional chemotactic systems.

The genome sequence of F113 showed that it contains three full chemotaxis systems (Che1, Che2 and Che3), plus thirty-six putative chemoreceptors (MCPs). The genetic organization of these gene clusters is shown in Fig. S4.2. In order to test the functionality of these systems, mutants affecting each of the three *cheA* genes were constructed. The three mutants were tested for growth in SA and LB media under aerobic and denitrification conditions. None of the mutants showed differences in growth rate or yield in any of the media or growth conditions. The mutants were also observed by phase contrast microscopy. Although the three mutants were motile, they showed important differences with the wild-type strain. While F113 cells showed a swimming pattern characterized by frequent changes of direction, *cheA1*⁻ and *cheA3*⁻ cells did not change direction and only followed straight trajectories. An intermediate phenotype was observed for *cheA2*⁻ cells, where only a few cells changed direction occasionally. Figure 4.3 shows the swimming phenotypes of each of the mutants under aerobic and anaerobic conditions.

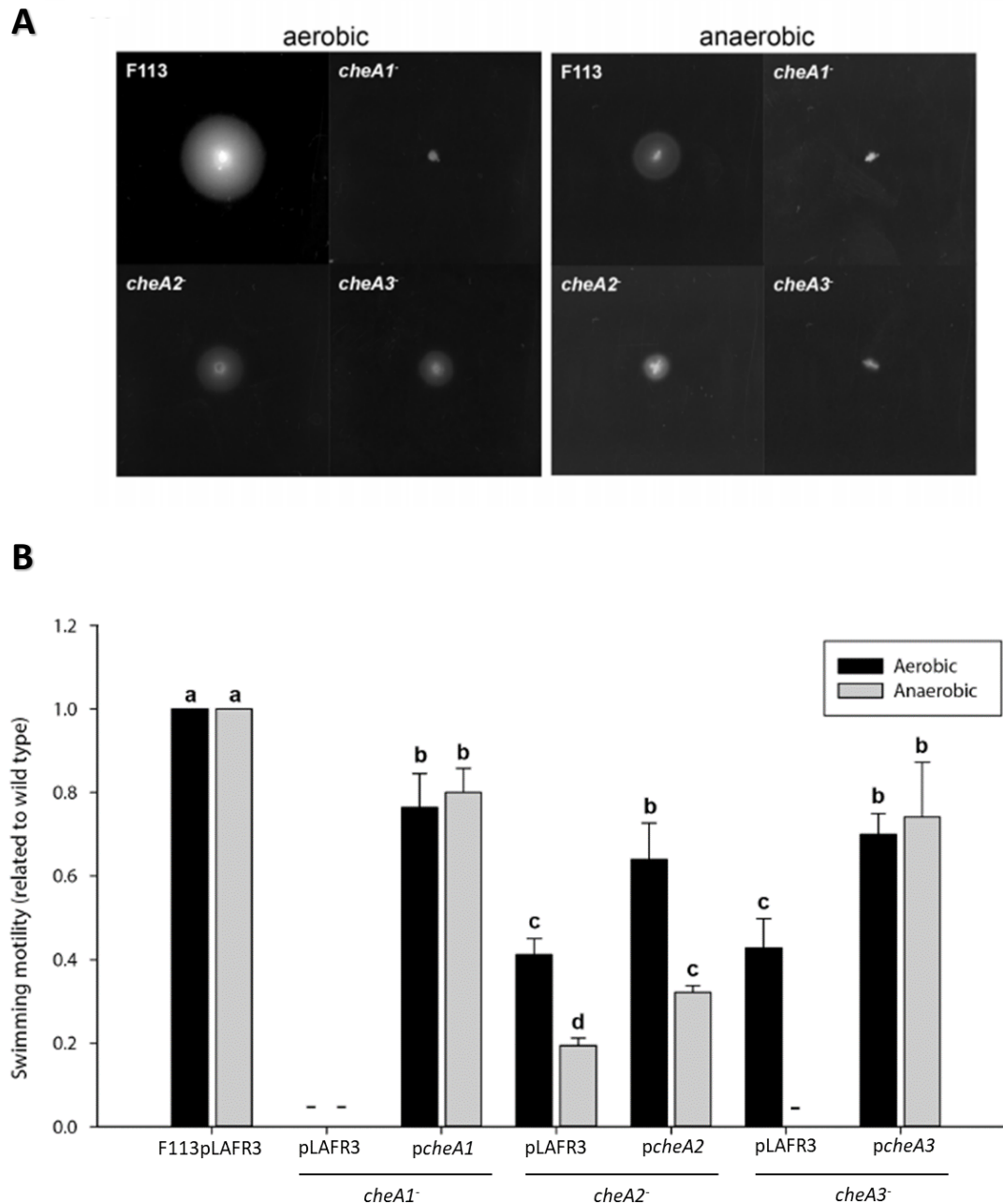


Figure 4.3: *P. fluorescens* possesses three independent and functional chemotaxis systems. (A) Swimming motility phenotype of *P. fluorescens* F113 and its mutants affected in either of the three *cheA* genes under aerobic and anaerobic (denitrification) conditions. Swimming haloes were measured after 18h (aerobic) and 48h (anaerobic) inoculation on SA (0.3% agar). The experiments were repeated three times in triplicate. Typical images are shown. **(B)** Complementation analysis of the three *cheA* mutants. Each of the mutants was complemented with cosmids from the F113 gene library which hybridized with each of the *cheA* probes: *pcheA1*; *pcheA2* and *pcheA3*. The pLAFR3 vector was introduced in F113 and each of the three mutants for controls. Swimming motility haloes were determined as above on medium supplemented with tetracycline. The experiments were repeated three times in triplicate. (-) indicates not detectable movement. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Under aerobiosis, the major effect was observed in the *cheA1* mutant that was unable to swim under these conditions. Mutation of *cheA2* and *cheA3* also resulted in a reduction in motility, as judged by halo reduction, an effect that was higher in the *cheA3* mutant. As shown in Figure 4.3B, cosmids from an F113 genomic library which contained the genes encoding the respective Che systems were isolated by colony hybridization and were able to partially complement the swimming defects of the mutants. These results show that the three Che systems are functional and independent in F113. The swimming motility of the three mutants was also tested under denitrification conditions. As shown in Figure 4.3A the three mutants were also affected in swimming motility under anaerobic conditions. The phenotypes of *cheA1* and *cheA2* mutants were similar to their phenotypes under aerobic conditions. However, under anaerobic denitrification conditions, the *cheA3* mutant was non-motile, presenting the same phenotype that the *cheA1* mutant. The *cheA1*, *cheA2* and *cheA3* phenotypes were partially complemented by the cosmids containing their wild-type counterparts (Fig. 4.3B). These results indicate that chemotaxis is different under aerobic and denitrification conditions. They also show that *cheA1* gene is essential for chemotactic motility both under aerobic and denitrification conditions, while *cheA3* gene is essential for chemotactic motility only under denitrification conditions.

The three chemotaxis systems are important for rhizosphere colonization.

Chemotactic motility is one of the most important traits for competitive rhizosphere colonization. In order to investigate the relative importance of each of the Che systems for colonization, we tested the performance of each of the *cheA* mutants in competition with the wild-type strain, with a root-tip assay. As shown in Figure 4.4, the three mutants were impaired in competitive colonization of the root tip, showing significant difference ($p < 0.05$) when competing with the wild-type strain. The higher defect was observed with the *cheA1* mutant that was displaced by the wild-type strain. The *cheA2* and *cheA3* mutants were always recovered in lower numbers than the wild-type strain, therefore showing a minor but significant impairment in competitive rhizosphere colonization. No significant difference in competitiveness was observed between the *cheA2* and *cheA3* mutants. The three chemotaxis systems are therefore required for optimal performance in the rhizosphere.

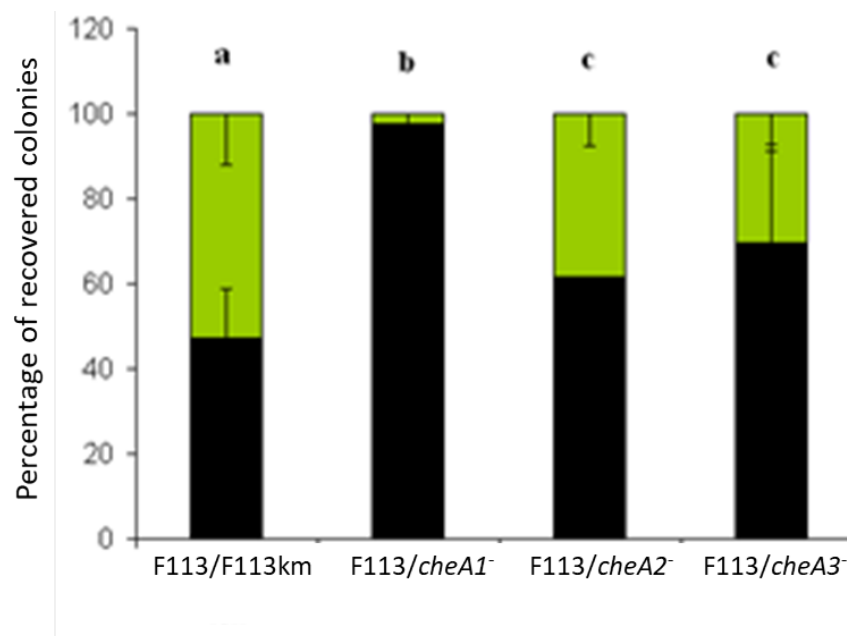


Figure 4.4: The three chemotaxis systems are important for rizhosphere colonization. Competitive colonization root-tip assay of *P. fluorescens* F113 and isogenic mutants affected in either of the *cheA* genes. Equal amounts (10^8 cells) of F113 and its competitors were inoculated per plant. F113 was also compared with an isogenic strain tagged with a kanamycin resistance gene as control. Experiments were done in triplicate with 20 plants in each experiment. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Discussion

Pseudomonas fluorescens F113 can grow both aerobically and anaerobically. Anaerobic growth is based in denitrification, being able to use both nitrate and nitrite as final electron acceptors. The presence in the F113 genome of complete sets of *nor* and *nos* genes (Redondo-Nieto *et al.*, 2013), suggests that nitric oxide and nitrous oxide are also putative electron acceptors for this strain and that molecular dinitrogen is the final product of denitrification. Under anaerobic conditions, growth yield for F113 is higher when nitrate is used as the electron acceptor and when the bacterium is grown on a rich medium. The results presented in Table 4.1 show that increasing the concentration of the electron acceptors, yield also increased, indicating that in our experimental conditions, growth is limited by the electron acceptor. However levels of nitrate higher than 40 mM or nitrite 10mM reduced yield, indicating toxicity of both nitrogenated compounds. Although these concentrations are much higher than those encountered in soils, it is likely that growth on

nitrate and nitrite are physiological relevant, since for *P. aeruginosa* optimal growth has been shown to occur at 100 mM nitrate (Williams *et al.*, 1978), but growth has been observed with nitrate concentrations as little as 62.5 μ M (Line *et al.*, 2014). When denitrification occurs at optimal electron acceptors concentration (Fig. 4.1), the growth rate does not appear to depend on the availability of other nutrients, including iron. It is therefore likely that in the rhizosphere, where nitrate and nitrite will be limiting, growth rates are lower than those observed here. The importance of denitrification has been highlighted in a recent study of 23 strains of pseudomonads able to colonize the tomato rhizosphere under natural soil conditions (Ghirardi *et al.*, 2012). In this study, it was shown that the ability to use alternative electron acceptors was more important for rhizosphere competence than the ability to use specific carbon sources. Furthermore, survival in the rhizosphere was also related to denitrification ability.

Under anaerobic conditions, *P. fluorescens* F113 is motile when nitrate is the final electron acceptor, but not when nitrite is used. However, cells grown on nitrite are flagellated, as shown by microscopy inspection and by its immediate motility after shifting to aerobic conditions. It is likely that the shortage in energy provided by nitrite reduction is responsible of the lack of motility under these conditions. Swimming motility haloes are smaller under anaerobic conditions than under aerobic conditions, suggesting that reduced motility is also related with the amount of energy harvested by the different electron acceptors. Regarding motility regulation, it seems to be very similar, if not identical under aerobic and anaerobic conditions, since the swimming phenotypes of hypermotile mutants affected in flagella synthesis (*gacA*, *algU*, *kinB*, *sadB*) (Navazo *et al.*, 2009) and flagella rotation (*wspR*) (Martinez-Granero *et al.*, 2014a) are similar under both conditions. This is not the case for chemotaxis, since different mutants have different phenotypes under aerobic and anaerobic conditions, indicating differences in chemotactic behavior.

Conversely to other pseudomonads, which harbor one or two chemotaxis apparatus, *P. fluorescens* Subgroup I strains, such as F113 and NFM421 harbor three, named Che1, Che2 and Che3 (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). Che1 is the canonical chemotaxis system present in all pseudomonads. Similarly to other species, in F113 the genes encoding this system are located in two widely spaced gene clusters (PSF113_1586-1594 and PSF113_4455-4456). This system is absolutely required for chemotaxis in *P. aeruginosa* (Ferrandez *et al.*, 2002)

and we have observed the same for F113, both under aerobic and anaerobic conditions, indicating that in F113, the Che1 system is also the most important chemotaxis system. The F113 Che3 system is encoded by genes located in a single gene cluster (PSF113_3554-3563) that contains two genes encoding MCPs. This gene cluster shows syntenic organization with the Che2 system in *P. aeruginosa*, although gene homology is limited. In *P. aeruginosa* it has been shown that this system is not essential for chemotactic motility, but it is required for optimal chemotaxis (Ferrandez *et al.*, 2002). We have observed a similar phenotype for a mutant affected in the *cheA3* gene under aerobic conditions. However, the F113 *cheA3* mutant did not show chemotactic motility under anaerobic, denitrifying conditions, suggesting that the Che3 system is absolutely required for chemotaxis under anaerobic conditions. To our knowledge, the implication of chemotaxis systems in *P. aeruginosa* or other pseudomonads has not been tested under denitrification conditions. It is therefore possible that the *P. aeruginosa* Che2 system is also implicated in chemotaxis under denitrification conditions. In this sense, it has been shown that McpB, a methyl accepting protein encoded within the Che2 gene cluster, contributes to aerotaxis in *P. aeruginosa* (Hong *et al.*, 2004, Hong *et al.*, 2005). The F113 Che2 system is encoded by a gene cluster (PSF113_2284-2292) paralogous to the F113 Che3 cluster. Mutation of the *cheA2* gene has shown that this system is not essential for chemotactic motility under aerobic or anaerobic conditions. However, similarly to Che2 in *P. aeruginosa* (Guvener *et al.*, 2006), optimal chemotaxis requires this system, both under aerobic and anaerobic conditions. Anyway, the lower degree of halo reduction, indicates that the Che2 system is less important than the Che3 system in F113 for chemotaxis. The results presented here show that flagella synthesis and rotation is regulated in a similar way under aerobic and anaerobic conditions. On the other hand, chemotactic signal transduction is different under aerobic and anaerobic conditions. We have also shown that the three systems are functional and independent. In *P. aeruginosa*, similar conclusions were reached, since Che1 and Che2 proteins did not form hybrid complexes (Guvener *et al.*, 2006).

Chemotaxis has been shown to play an important role for rhizosphere competitive colonization (de Weert *et al.*, 2002). In *P. fluorescens* Pf01 it has been shown that mutation in MCPs which detect aminoacids (Oku *et al.*, 2012) and organic acids (Oku *et al.*, 2014) present in root exudates are affected in rhizosphere colonization. In order to test the relative importance of each chemotactic system in F113, we have performed competitive

colonization assays. The results clearly show that the non-chemotactic mutant affected in *cheA1* was displaced from the rhizosphere by its isogenic wild-type strain, confirming the importance of chemotaxis for rhizosphere colonization. Both *cheA2* and *cheA3* mutants also showed a defect, although minor for competitive colonization. The least affected mutant was *cheA2*, in accordance with its proposed minor role in chemotaxis.

Acknowledgements

We are grateful to Javier Lloret and Eva Arrebola for critical discussions.

References

- Barahona E**, Navazo A, Martinez-Granero F, Zea-Bonilla T, Perez-Jimenez RM, Martin M & Rivilla R (2011) *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Applied and environmental microbiology* **77**: 5412-5419.
- Barahona E**, Navazo A, Yousef-Coronado F, Aguirre de Carcer D, Martinez-Granero F, Espinosa-Urgel M, Martin M & Rivilla R (2010) Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environmental microbiology* **12**: 3185-3195.
- Bertani G** (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **62**: 293-300.
- Bloemberg GV & Lugtenberg BJ** (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology* **4**: 343-350.
- Capdevila S**, Martinez-Granero FM, Sanchez-Contreras M, Rivilla R & Martin M (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889-3897.
- Carlson CA & Ingraham JL** (1983) Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and environmental microbiology* **45**: 1247-1253.
- De La Fuente L**, Landa BB & Weller DM (2006) Host Crop Affects Rhizosphere Colonization and Competitiveness of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* **96**: 751-762.
- de Weert S**, Vermeiren H, Mulders IH, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R & Lugtenberg BJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **15**: 1173-1180.
- Ditty JL**, Grimm AC & Harwood CS (1998) Identification of a chemotaxis gene region from *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology letters* **159**: 267-273.
- Fahraeus G** (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of general microbiology* **16**: 374-381.
- Ferrandez A**, Hawkins AC, Summerfield DT & Harwood CS (2002) Cluster II che genes from *Pseudomonas aeruginosa* are required for an optimal chemotactic response. *Journal of bacteriology* **184**: 4374-4383.
- Finan TM**, Kunkel B, De Vos GF & Signer ER (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of bacteriology* **167**: 66-72.
- Ghiglione JF**, Richaume A, Philippot L & Lensi R (2002) Relative involvement of nitrate and nitrite reduction in the competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of maize under non-limiting nitrate conditions. *FEMS microbiology ecology* **39**: 121-127.
- Ghirardi S**, Dessaint F, Mazurier S, Corberand T, Raaijmakers JM, Meyer JM, Dessaux Y & Lemanceau P (2012) Identification of traits shared by rhizosphere-competent strains of fluorescent pseudomonads. *Microbial ecology* **64**: 725-737.
- Greenberg EP & Becker GE** (1977) Nitrous oxide as end product of denitrification by strains of fluorescent pseudomonads. *Canadian journal of microbiology* **23**: 903-907.
- Güvener ZT**, Tifrea DF & Harwood CS (2006) Two different *Pseudomonas aeruginosa* chemosensory signal transduction complexes localize to cell poles and form and remould in stationary phase. *Molecular microbiology* **61**: 106-118.
- Hong CS**, Kuroda A, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H & Kato J (2004) The aerotaxis transducer gene aer, but not aer-2, is transcriptionally regulated by the anaerobic regulator ANR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bioscience and bioengineering* **97**: 184-190.
- Hong CS**, Kuroda A, Takiguchi N, Ohtake H & Kato J (2005) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* aer-2, one of two aerotaxis transducer genes, is controlled by RpoS. *Journal of bacteriology* **187**: 1533-1535.
- Kato J**, Nakamura T, Kuroda A & Ohtake H (1999) Cloning and characterization of chemotaxis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **63**: 155-161.
- Line L**, Alhede M, Kolpen M, et al. (2014) Physiological levels of nitrate support anoxic growth by denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* at growth rates reported in cystic fibrosis lungs and sputum. *Frontiers in microbiology* **5**: 554.
- Loper JE**, Hassan KA, Mavrodi DV, et al. (2012) Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS genetics* **8**: e1002784.

- Martinez-Granero F**, Capdevila S, Sanchez-Contreras M, Martin M & Rivilla R (2005) Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* **151**: 975-983.
- Martinez-Granero F**, Rivilla R & Martin M (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Applied and environmental microbiology* **72**: 3429-3434.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PloS one* **7**: e31765.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Gonzalez de Heredia E, Baena I, Martin-Martin I, Rivilla R & Martin M (2014a) Identification of *flgZ* as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PloS one* **9**: e87608.
- Martinez-Granero F**, Redondo-Nieto M, Vesga P, Martin M & Rivilla R (2014b) AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P. fluorescens* F113. *BMC genomics* **15**: 237.
- Miller SH**, Browne P, Prigent-Combaret C, Combes-Meynet E, Morrissey JP & O'Gara F (2010) Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology reports* **2**: 403-411.
- Naseby DC & Lynch JM** (2001) Effect of 2,4-Diacetylphloroglucinol Producing, Overproducing, and Nonproducing *Pseudomonas fluorescens* F113 in the Rhizosphere of Pea. *Microbial ecology* **42**: 193-200.
- Navazo A**, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martinez-Granero F, Rivilla R & Martin M (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial biotechnology* **2**: 489-498.
- Oku S**, Komatsu A, Tajima T, Nakashimada Y & Kato J (2012) Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization. *Microbes and environments* **27**: 462-469.
- Oku S**, Komatsu A, Nakashimada Y, Tajima T & Kato J (2014) Identification of *Pseudomonas fluorescens* chemotaxis sensory proteins for malate, succinate, and fumarate, and their involvement in root colonization. *Microbes and environments* **29**: 413-419.
- Philippot L**, Mirleau P, Mazurier S, Siblot S, Hartmann A, Lemanceau P & Germon JC (2001) Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes. *Biochimica et biophysica acta* **1517**: 436-440.
- Redondo-Nieto M**, Barret M, Morrissey J, et al. (2013) Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC genomics* **14**: 54.
- Sanchez-Contreras M**, Martin M, Villaceros M, O'Gara F, Bonilla I & Rivilla R (2002) Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of bacteriology* **184**: 1587-1596.
- Schäfer A**, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Scher FM & Baker R** (1982) Effects of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* **72**: 1567-1573.
- Shimizu TS**, Tu Y & Berg HC (2010) A modular gradient-sensing network for chemotaxis in *Escherichia coli* revealed by responses to time-varying stimuli. *Molecular systems biology* **6**: 382.
- Silby MW**, Cerdano-Tarraga AM, Vernikos GS, et al. (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome biology* **10**: R51.
- Simons M**, van der Bij AJ, Brand I, de Weger LA, Wijffelman CA & Lugtenberg BJ (1996) Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **9**: 600-607.
- von Felten A**, Meyer JB, Defago G & Maurhofer M (2011) Novel T-RFLP method to investigate six main groups of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads in environmental samples. *Journal of microbiological methods* **84**: 379-387.
- Williams DR**, Rowe JJ, Romero P & Eagon RG (1978) Denitrifying *Pseudomonas aeruginosa*: some parameters of growth and active transport. *Applied and environmental microbiology* **36**: 257-263.

Supplementary

Supplementary

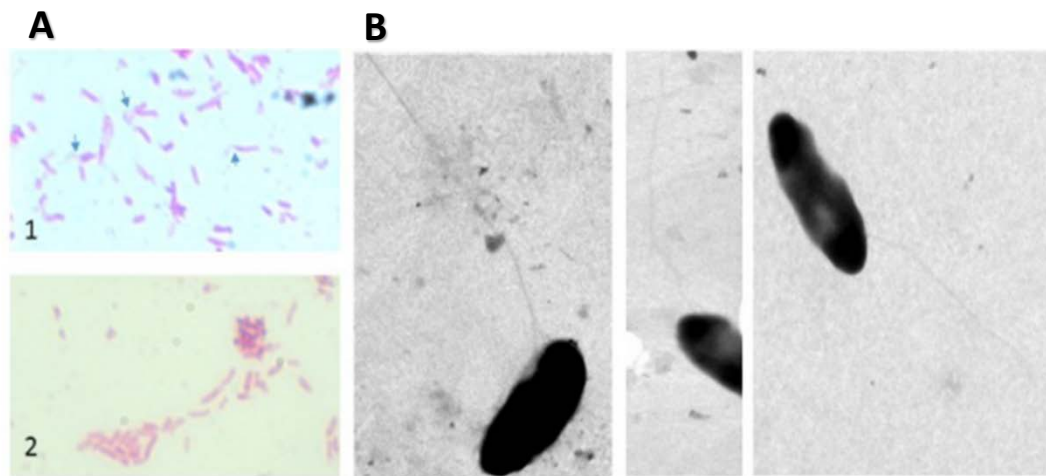


Figure S4.1: Flagella visualization. (A) Visualization of flagella under optical microscope under Leiffson staining. (A1) *P. fluorescens* F113 grown under anaerobic conditions with nitrite as the final electron acceptor. Arrows point to flagella. (A2) *P. fluorescens* F113 *fliC* mutant grown under the same conditions. This mutant does not have flagella. (B) Transmission electron microscopy of negative staining of F113 growing anaerobically with nitrite as final electron acceptor.

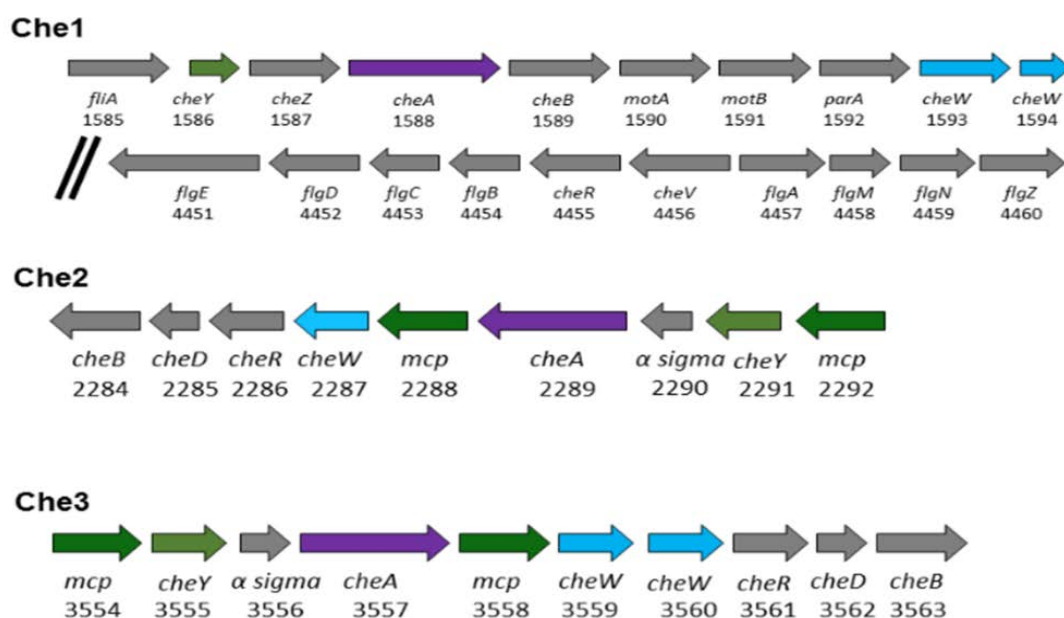


Figure S4.2: Genetic organization of the three chemotaxis systems. (Redondo-Nieto *et al.*, 2013)

4. Chemotactic motility of *P. fluorescens* F113 under aerobic and denitrification conditions

Strains and plasmids	Description	Reference or source
Strains		
DH5α	<i>E. coli</i> cloning strain	Gibco-BRL
F113rif	<i>P. fluorescens</i> wild-type Rif ^R	(Shanahan <i>et al.</i> , 1992)
F113cheA1 ⁻	F113rif cheA1 ⁻ Rif ^R Km ^R	This work
F113cheA2 ⁻	F113rif cheA2 ⁻ Rif ^R Km ^R	This work
F113cheA3 ⁻	F113rif cheA3 ⁻ Rif ^R Km ^R	This work
F113gacS ⁻	F113rif gacS ⁻ Rif ^R Km ^R	(Martinez-Granero <i>et al.</i> , 2006)
F113sadB ⁻	F113rif sadB ⁻ Rif ^R Km ^R	(Navazo <i>et al.</i> , 2009)
F113algU ⁻	F113rif algU ⁻ Rif ^R Km ^R	(Martinez-Granero <i>et al.</i> , 2012)
F113wspR ⁻	F113rif wspR ⁻ Rif ^R Spc ^R	(Navazo <i>et al.</i> , 2009)
F113kinB ⁻	F113rif kinB ⁻ Rif ^R Km ^R	(Barahona <i>et al.</i> , 2011)
F113pcheA1	F113rif cheA1 pLFAR3cheA1 Rif ^R Km ^R Tc ^R	This work
F113pcheA2	F113rif cheA2 pLFAR3cheA2 Rif ^R Km ^R Tc ^R	This work
F113pcheA3	F113rif cheA3 pLFAR3cheA3 Rif ^R Km ^R Tc ^R	This work
Plasmids		
pGEM-T Easy vector	Cloning vector; Amp ^R	Promega
pRK600	Helper plasmid, Cm ^R	(Finan <i>et al.</i> , 1986)
pK18mobsacB	pUC18 derivative lacZ mob site sacB, KmR	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pBG 2076	pLAFR3 derivative containing the cheA1 gen; Tc ^r	This work
pBG 1994	pLAFR3 derivative containing the cheA2 gen; Tc ^r	This work
pBG 1988	pLAFR3 derivative containing the cheA3 gen; Tc ^r	This work

Table S4.1: Bacterial strains and plasmids used in this study.

Name	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Length
CheA1 F	CAGTATGTTTCAGCGAAGTGC	60	608 bp
CheA1 R	CCTTTGCCATGCAGCTCATC	62	
CheA2 F	CAGCGATCATATGCTGGAGC	62	681 bp
CheA2 R	CACCAGGTTGATCAGTTCGT	60	
CheA3 F	GAGTGCCTTGTTCTGGAAG	62	709 bp
CheA3 R	GAATCAGATTACCTTCTGCCG	62	
CheA1 ^{tot} F	GGAGCAGCCATTAATGAGC	58	2270 bp
CheA1 ^{tot} R	CCAGAATCAAATACGCCGG	58	
CheA2 ^{tot} F	GGATATGAGCGTGAGCAT	58	2102 bp
CheA2 ^{tot} R	GAATTGCTAAAGCGTCAGC	56	
CheA3 ^{tot} F	CGCCCATGAATCTGGACG	58	2129 bp
CheA3 ^{tot} R	GAATATTGAGTCAATTCAGG	58	

Table S4.2: Primers used in this study.

References

- Barahona E**, Navazo A, Martinez-Granero F, Zea-Bonilla T, Perez-Jimenez RM, Martin M & Rivilla R (2011) *Pseudomonas fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability and improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Applied and environmental microbiology* **77**: 5412-5419.
- Finan TM**, Kunkel B, De Vos GF & Signer ER (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of bacteriology* **167**: 66-72.
- Martinez-Granero F**, Rivilla R & Martin M (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Applied and environmental microbiology* **72**: 3429-3434.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS one* **7**: e31765.
- Navazo A**, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martinez-Granero F, Rivilla R & Martin M (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial biotechnology* **2**: 489-498.
- Redondo-Nieto M**, Barret M, Morrissey J, et al. (2013) Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC genomics* **14**: 54.
- Schäfer A**, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G & Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Shanahan P**, O'Sullivan D J, Simpson P, Glennon JD & O'Gara F (1992) Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and environmental microbiology* **58**: 353-358.

Anexo Capítulo 4

Análisis de perfiles quimiotácticos

El éxito de una eficiente colonización de la rizosfera por parte de las PGPRs depende de la respuesta quimiotáctica hacia los exudados radiculares (Souza *et al.*, 2015). Durante una estancia en el grupo de la Dra. R. Parales (Davis, California) se analizaron los perfiles quimiotácticos hacia diferentes compuestos por parte de *P. fluorescens* F113 y de los mutantes en los tres sistemas quimiotácticos que presenta (Muriel *et al.*, 2015). Para ello se llevó a cabo un análisis mediante el método de gradiente en placa de agar (*gradient plate assay*) como se indica en (Parales & Ditty, 2018). Este método involucra movimiento, por lo que no fue realizado con el mutante *cheA1*, al tener un fenotipo inmóvil. la respuesta quimiotáctica a compuestos presentes en los exudados de las raíces, como son aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares (Oku *et al.*, 2012) fue estudiada. También fue analizada la respuesta a diferentes compuestos aromáticos que pueden encontrarse en el suelo (Shingler, 2003). Todos los compuestos fueron ensayados a una concentración de 10mM y se detallan en la tabla A4.1.

Blanco (control)	50 mM PBS (pH 7.0), 0.05% glicerol, 10 μ M EDTA)
Control positivo	Casaminoácidos 2% (w/v)
Aminoácidos	Asparagina Aspartato Glutamina Leucina Serina
Ácidos orgánicos	Ácido maleico Citrato Malato Fumarato Succinato
Azúcares	Glucosa Fructosa Sacarosa
Compuestos aromáticos	Benzoato Catecol Protocatecuato Salicilato
Compuestos inorgánicos	Nitrato (KNO ₃)

Tabla A4.1: Compuestos analizados en los ensayos de perfiles quimiotácticos.

El método de gradiente en placa de agar permite cuantificar la respuesta quimiotáctica bacteriana hacia compuestos químicos. Esta cuantificación se relativiza al llamado índice de respuesta (RI, del inglés *response index*), el cual se calcula mediante la siguiente formula: $RI = D1 / (D1 + D2)$, donde D1 es la distancia máxima del halo de movimiento, desde el punto de inocuación hasta el borde de movimiento hacia el compuesto a ensayar, y D2 la distancia del halo desde el punto de inoculación hasta el borde contrario al lugar donde se encuentra el compuesto a ensayar. Para que un compuesto sea considerado quimioatrayente debe tener un RI superior a 0.52, mientras que los que tienen RI menores a 0.48 se consideran quimiorrepelentes. Los valores intermedios son considerados como respuesta no quimiotáctica (Pham & Parkinson, 2011).

Los resultados obtenidos se muestran a través de un heatmap (Fig. A4.1) en el que están representados los valores (RI) en un gradiente de color, indicando las respuestas más debiles en color amarillo e incrementando la tonalidad hacia naranja en aumento de respuesta quimiotáctica. En las tres cepas ensayadas, ningun compuesto resultó ser quimiorrepelente, por lo que el valor mínimo de RI fue 0.5, que indica no respuesta, para el control negativo y algunos compuestos, como el ácido maleico y el salicilato en el caso del mutante *cheA2* o el nitrato para el mutante *cheA3*. Por otro lado, el valor de mayor atracción fue un RI de 0.7 para el aminoácido asparragina en el caso del mutante *cheA2*. Estos datos muestran que la respuesta quimiotáctica de *P. fluorescens* F113 es positiva para los compuestos que de manera natural aparecen en los exudados radiculares. Además, no se han observado diferencias significativas en los perfiles de quimiotaxis de la estirpe silvestre en comparación con los mutantes ensayados, siendo más parecido el comportamiento quimiotáctico entre F113 y el mutante *cheA3*. Este mutante no presenta respuesta a nitrato, lo que apoya su esencial función en condiones limitantes de oxígeno (Muriel *et al.*, 2015). Por otro lado, ha sido descrito que, dentro de los compuestos presentes en los exudados radiculares, son los aminoácidos y los ácidos orgánicos los preferidos por las pseudomonas fluorescents (Gupta Sood, 2003), corroborado con este análisis para *P. fluorescens* F113. El hecho de presentar *cheA2* menor respuesta quimiotáctica que la estirpe silvestre hacia el ácido maleico podría sugerir la implicación de este sistema en una eficaz colonización de la rizosfera, ya que este acido orgánico se encuentra muy representado en los exudados radiculares. Estos resultados muestran un análisis preliminar del perfil quimiotáctico de

F113, así como de los comportamientos de los mutantes en la histidín quinasa CheA de los sistemas Che2 y Che3, pudiendo afirmar que ambos sistemas están implicados en la detección de algunos de los compuestos presentes en la rizosfera.

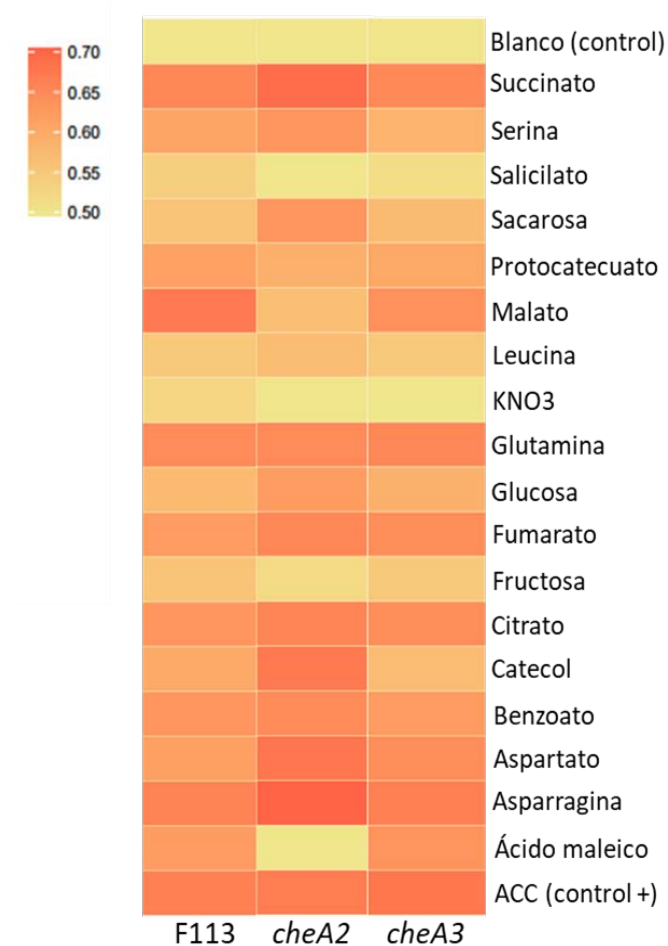


Figura A4.1: Perfiles quimiotácticos de *P. fluorescens* F113 y los mutantes *cheA2* y *cheA3*. El heatmap fue construido utilizando los valores RI de cada cepa hacia cada uno de los compuestos ensayados, mediante el paquete ggplot2 del programa R. Cada experimento fue repetido en triplicado en tres ensayos independientes.

Referencias

- Gupta Sood S** (2003) Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS microbiology ecology* **45**: 219-227.
- Muriel C**, Jalvo B, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2015) Chemotactic Motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. *PloS one* **10**: e0132242.
- Oku S**, Komatsu A, Tajima T, Nakashimada Y & Kato J (2012) Identification of chemotaxis sensory proteins for amino acids in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and their involvement in chemotaxis to tomato root exudate and root colonization. *Microbes and environments* **27**: 462-469.
- Parales RE & Ditty JL** (2018) Chemotaxis to Atypical Chemoattractants by Soil Bacteria. *Methods in molecular biology* **1729**: 255-280.
- Pham HT & Parkinson JS** (2011) Phenol sensing by *Escherichia coli* chemoreceptors: a nonclassical mechanism. *Journal of bacteriology* **193**: 6597-6604.
- Shingler V** (2003) Integrated regulation in response to aromatic compounds: from signal sensing to attractive behaviour. *Environmental microbiology* **5**: 1226-1241.
- Souza R**, Ambrosini A & Passaglia LM (2015) Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology* **38**: 401-419.

Capítulo 5

Discusión General

El movimiento dependiente de flagelos está asociado a un modo de vida libre de las bacterias, siendo por tanto un factor clave en el proceso de colonización de la rizosfera por parte de las PGPRs. Mutantes inmóviles, o que presentan reducida su movilidad no realizan de manera competente la colonización de la rizosfera, mientras que cepas hipermóviles y variantes fenotípicos seleccionados de forma natural en este nicho, son colonizadores competentes de este ambiente (de Weert *et al.*, 2002, Capdevila *et al.*, 2004, Martínez-Granero *et al.*, 2006). Debido a que la movilidad dependiente de flagelo ha sido descrita como uno de los factores más determinantes para que se lleve a cabo una colonización competente y a que las rizobacterias tienen que adaptarse a los cambios que se producen en un nicho ecológico como es el rizosférico, el objetivo principal de esta Tesis ha sido aumentar el conocimiento sobre los mecanismos que regulan la movilidad en respuesta a factores ambientales en *Pseudomonas fluorescens* F113, PGPR que coloniza de manera competente muchas plantas de interés agrícola.

En el capítulo 2 de esta memoria de Tesis se analiza el efecto de la proteína reguladora AmrZ en la activación o represión de genes relacionados con el segundo mensajero c-di-GMP. El estudio de este segundo mensajero ha emergido en los últimos años como protagonista en la regulación de muchos procesos bacterianos, entre los que se encuentra la transición de un estilo de vida móvil a uno sésil o de formación de biopelículas, en respuesta a factores ambientales (Schirmer, 2016). AmrZ es un regulador transcripcional altamente conservado en las pseudomonas, que puede tanto activar como reprimir la expresión de genes relacionados con la adaptación al ambiente como son: la movilidad, la homeostasis del hierro, la producción de exopolisacáridos y la formación de biopelículas (Wozniak *et al.*, 2003, Ramsey & Wozniak, 2005, Baynham *et al.*, 2006, Tart *et al.*, 2006, Jones *et al.*, 2013, Martínez-Granero *et al.*, 2014b). Además, ha sido descrito que AmrZ utiliza diferentes mecanismos para activar o reprimir la expresión génica (Pryor *et al.*, 2012). Análisis previos en *P. fluorescens* F113 han mostrado que AmrZ regula la movilidad tipo *swimming* a través de la represión del regulador maestro de la síntesis del flagelo típico de pseudomonas, *fleQ* (Martínez-Granero *et al.*, 2012), así como de los reguladores principales de la síntesis del segundo aparato flagelar, *flhDC* (Martínez-Granero *et al.*, 2014b, Barahona *et al.*, 2016). A su vez, AmrZ requiere para su activación al factor sigma AlgU, formando ambos, AmrZ y AlgU, el nodo central de la regulación de la movilidad dependiente de flagelos de *P. fluorescens* F113. Análisis de ChIP-Seq para determinar los sitios de unión de

AmrZ, tanto en *P. fluorescens* F113 (Martinez-Granero *et al.*, 2014b), como en *Pseudomonas aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014) han mostrado que AmrZ afecta a la transcripción de cientos de genes en ambas cepas, predominando su función como represor (Jones *et al.*, 2014, Martinez-Granero *et al.*, 2014b). Gracias a este análisis se identificó que, en *P. fluorescens* F113, AmrZ regula varias proteínas implicadas en la síntesis y degradación del segundo mensajero c-di-GMP, cobrando gran importancia la implicación de este factor transcripcional en la adaptación de esta cepa al ambiente rizosférico (Martinez-Granero *et al.*, 2014b).

En *P. fluorescens* F113 la interrupción de *amrZ* genera un fenotipo pleiotrópico, presentando hipermovilidad, disminución en la formación de biopelículas y muy afectada su capacidad competitiva a la hora de colonizar las raíces de las plantas (Muriel *et al.*, 2018). Aunque ha sido demostrado que en *P. fluorescens* F113 los fenotipos hipermóviles son más competitivos que la estirpe silvestre (Martinez-Granero *et al.*, 2006, Navazo *et al.*, 2009), de manera independiente de su capacidad de formar biopelículas (Barahona *et al.*, 2016), el mutante *amrZ* muestra un fenotipo de competencia propio de mutantes inmóviles o de baja movilidad (Capdevila *et al.*, 2004, Muriel *et al.*, 2015). Similar fenotipo de hipermovilidad y defectuosa colonización de superficies ha sido identificado por el mutante en el gen *amrZ* de *P. aeruginosa* (Tart *et al.*, 2005, Tart *et al.*, 2006, Waligora *et al.*, 2010). Este resultado sugiere que, además de la movilidad, existen otros factores regulados por AmrZ que están implicados en un proceso de colonización eficaz y competente. Se ha descrito en *P. aeruginosa* que el mutante en *amrZ* es menos virulento debido a una disminución de su capacidad de colonizar el tejido pulmonar, a pesar de presentar también un fenotipo hipermovil. En este trabajo identifican que la presencia de AmrZ durante la infección genera una ventaja competitiva al actuar como activador transcripcional de determinados genes involucrados en virulencia (Waligora *et al.*, 2010). En cuanto a la deficiencia en la colonización de la rizosfera por parte del mutante en *amrZ* de *P. fluorescens* F113, es posible que esté también debido, entre otros factores, a la no expresión de determinados factores de secreción y otros compuestos como los sideróforos, regulados por AmrZ según el análisis de ChIP-Seq (Martinez-Granero *et al.*, 2014b) y RNA-Seq (Redondo Nieto *et al.*, en preparación). La regulación de factores de virulencia y sideróforos ha sido también demostrado en *P. aeruginosa* (Jones *et al.*, 2013).

En cambio, la formación de biopelículas por el mutante *amrZ* presenta fenotipos opuestos en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* F113. El mutante *amrZ* de *P. aeruginosa*, presenta un aumento en la formación de biopelículas y altos niveles de c-di-GMP, mientras que éste mutante de *P. fluorescens* F113 tiene muy disminuida su capacidad para formar biopelículas y muy bajos niveles de c-di-GMP intracelular. Se ha descrito que el aumento en la formación de biopelículas que presenta el mutante en *amrZ* de *P. aeruginosa* es consecuencia de la sobre-producción de exopolisacáridos, concretamente del exopolisacárido Psl, aunque también regula otros como Pel o alginato (Jones *et al.*, 2013, Xu *et al.*, 2016) y de los altos niveles intracelulares de c-di-GMP (Jones *et al.*, 2014). Sin embargo, *P. fluorescens* F113 es una cepa que no produce celulosa ni presenta en su genoma los genes *pel* o *psl* que codifiquen para estos exopolisacáridos. En este caso, la deficiente formación de biopelículas de este mutante podría deberse a la regulación llevada a cabo por AmrZ de otros exopolisacáridos o componentes extracelulares presentes en el genoma de F113. Este hecho, se ve apoyado por los resultados obtenidos en la tinción de Congo-Red realizada en el mutante *amrZ* y la estirpe silvestre (Muriel *et al.*, 2018).

En lo que concierne a la regulación de los niveles intracelulares de c-di-GMP por AmrZ encontramos diferencias en ambas cepas, siendo opuestos los niveles de este segundo mensajero. Se ha descrito que en *P. aeruginosa* solamente una DGC, GcbA (PA4843), es reprimida por AmrZ (Jones *et al.*, 2014), mientras que en *P. fluorescens* F113, según los resultados de los análisis de ChIP-Seq (Martinez-Granero *et al.*, 2014b) y RNA-Seq (Redondo-Nieto *et al.*, en preparación), AmrZ activa y reprime la transcripción de varios genes que codifican DGCs y PDEs (Muriel *et al.*, 2018). En concreto, los análisis de RNA-Seq en F113 muestran que más de un 65% de los genes relacionados con el metabolismo del c-di-GMP están regulados por AmrZ. Esta regulación es principalmente positiva, activando la transcripción de 25 genes mientras que sólo cinco son reprimidos. Estos resultados corroboran los obtenidos previamente mediante el análisis de ChIP-Seq, en el que se identificó la unión de AmrZ a 14 secuencias promotoras de genes relacionados con el metabolismo del c-di-GMP (Martinez-Granero *et al.*, 2014b). Dentro de estos genes se encuentra *gcbA* (PSF113_0661), pero a diferencia de lo que ocurre en *P. aeruginosa*, en *P. fluorescens* F113 AmrZ activa la transcripción del gen que codifica esta DGC. En resumen, el regulador transcripcional global AmrZ determina los niveles intracelulares de c-di-GMP tanto en *P. aeruginosa* como en *P. fluorescens* F113 (Jones *et al.*, 2013, Muriel *et al.*, 2018).

Una vez conocidos los genes relacionados con el metabolismo del c-di-GMP regulados por AmrZ en *P. fluorescens* F113, se obtuvieron mutantes en ocho de estos genes, aquellos cuya regulación era directa. El análisis de los fenotipos de movilidad y formación de biopelículas mostró que a excepción de *gcbB* (PSF113_1438), que codifica una posible DGC, todos los mutantes están afectados en uno o ambos fenotipos. En el caso de *DipA* (PSF113_0499), descrita en *P. aeruginosa* como una importante PDE encargada de disminuir los niveles intracelulares de c-di-GMP para facilitar el paso de vida sésil a vida móvil (Roy *et al.*, 2012), en *P. fluorescens* F113 se comporta como una DGC, presentando el mutante en el gen que la codifica un fenotipo de hipermovilidad con una capacidad muy disminuida para formar biopelículas (Muriel *et al.*, 2018). El hecho de no haber sido posible complementar la mutación en *dipA* y de que su motivo GGDEF esté muy degenerado, podría indicar que está actuando como dominio alostérico de unión al c-di-GMP junto con los dominios reguladores PAS y GAF que también contiene esta proteína. Es importante comentar que en los últimos años se están identificando varios mecanismos de regulación de los niveles del c-di-GMP a nivel local en el que parecen estar involucradas proteínas con ambos dominios, GGDEF y EAL/HD-GYP, más otros dominios reguladores, actuando como nodos de interacción entre PDEs y DGCs (Yan *et al.*, 2017). De hecho, en *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 se ha demostrado la unión física de PDEs, DGCs y proteínas efectoras (Dahlstrom *et al.*, 2015) y recientemente también en *Escherichia coli*, donde varias DGCs y PDEs forman super-módulos de interacción (Sarenko *et al.*, 2017).

Estos resultados muestran que AmrZ no solo contribuye a la movilidad de *P. fluorescens* F113 mediante el control transcripcional de reguladores de la síntesis de flagelos, sino que también regula la movilidad modulando los niveles de c-di-GMP. Cabe destacar que en esta regulación parece dominar el proceso de formación de biopelículas, ya que de los ocho genes analizados, relacionados con el c-di-GMP y regulados por AmrZ, seis presentan diferencias significativas en el proceso de formación de biopelículas con respecto a la estirpe silvestre (Muriel *et al.*, 2018). En un trabajo reciente del grupo de O'Toole, llevado a cabo con la cepa *P. fluorescens* Pf0-1, también se describe que la mayoría de los genes involucrados en la detección y mantenimiento de los niveles de c-di-GMP están relacionados con la formación de biopelículas. No obstante, no se descarta que estas proteínas relacionadas con el c-di-GMP puedan tener otras funciones celulares (Dahlstrom *et al.*, 2018).

En el capítulo 3 de esta memoria se profundiza acerca de la regulación de la síntesis del aparato flagelar de *P. fluorescens* F113 a través de señales ambientales, destacando la posible función que pueda tener el c-di-GMP. La síntesis del aparato flagelar típico de *Pseudomonas* depende del regulador transcripcional FleQ y del factor sigma FliA (Arora *et al.*, 1997, Dasgupta *et al.*, 2003). Estas proteínas a su vez se encuentran reguladas por las condiciones ambientales. En *P. fluorescens* F113 han sido descritas dos rutas de regulación implicadas en la síntesis del flagelo, una a través de la proteína citoplasmática SadB y otra a través del sistema de dos componentes GacA/GacS, que responde a señales ambientales. Ambas rutas convergen en el factor sigma AlgU, requerido para la expresión de AmrZ y que a su vez reprime la expresión de *fleQ* (Martinez-Granero *et al.*, 2012). Aunque las señales que activan ambas rutas son desconocidas, sí ha sido sugerida la implicación del c-di-GMP en la función de SadB (Merritt *et al.*, 2007). Se ha descrito que el c-di-GMP regula la función flagelar (Petrova *et al.*, 2014, Martinez-Granero *et al.*, 2014a, Trampari *et al.*, 2015, Baker *et al.*, 2016), sin embargo, poco se sabe acerca de la función de este segundo mensajero en la regulación de la síntesis del flagelo. Estudios previos han mostrado que el c-di-GMP se une a FleQ restringiendo la transcripción de los genes de síntesis del flagelo (Baraquet & Harwood, 2013). Por otro lado, también se sabe que SadB une c-di-GMP en *P. fluorescens* F113 (Trampari, 2016).

Para analizar la implicación del c-di-GMP en la regulación de la biosíntesis del flagelo se utilizaron las dos DGCs reguladas positivamente por AmrZ y que más contribuían al fenotipo de movilidad, PSF113_0661 o GcbA y PSF113_1982 o AdrA. Ambas DGCs están codificadas en los genomas de otras cepas de *Pseudomonas* (Paulsen *et al.*, 2005, Newell *et al.*, 2009). Los análisis de epistasia de estos genes con *sadB* han revelado la existencia de interacción genética entre ambas DGCs y SadB, tanto para la regulación de la movilidad tipo *swimming* como para la regulación de la formación de biopelículas. Por tanto, ambas DGCs están implicadas en la misma ruta de síntesis del flagelo que SadB en *P. fluorescens* F113. Además, los fenotipos obtenidos en los mutantes simples y múltiples sugieren que AdrA actúa por encima de SadB mientras que GcbA actúa por debajo en la ruta de señalización.

En *P. aeruginosa* se ha descrito que GcbA está implicada tanto en la unión irreversible a superficies, como del proceso contrario, la dispersión de la biopelícula (Petrova *et al.*, 2015). Además, al igual que sucede en *P. fluorescens* F113, en *P. aeruginosa*

y en *Pseudomonas putida*, esta proteína no tiene relevancia en la formación de biopelículas (Petrova *et al.*, 2014, Xiao *et al.*, 2016). Se ha sugerido que su función es sintetizar c-di-GMP, posiblemente junto a otras DGCs para regular la movilidad dependiente de flagelo (Petrova *et al.*, 2014, Petrova *et al.*, 2015). De manera similar podría estar actuando GcbA en *P. fluorescens* F113, sintetizando el c-di-GMP que, a través de la unión a *fleQ* inactiva su capacidad para activar la transcripción de los genes de síntesis del flagelo como ha sido descrito en *P. aeruginosa* (Baraquet & Harwood, 2013) y en *P. putida* KT2440 (Molina-Henares *et al.*, 2017). Además, al estar *gcbA* activada transcripcionalmente por AmrZ podría existir un mecanismo de retroalimentación positivo por parte de este regulador transcripcional para reprimir la síntesis del aparato flagelar en respuesta a factores ambientales. No obstante, GcbA podría estar implicada en otros procesos regulados a través de efectores diferentes a FleQ.

Por otro lado, la DGC AdrA está presente en varias cepas de las pseudomonas fluorescentes, pero no en *P. aeruginosa* (Paulsen *et al.*, 2005) y es en *P. fluorescens* F113 la primera vez que se describe su implicación en la formación de biopelículas y en la movilidad dependiente de flagelo (Muriel *et al.*, 2018). Los análisis de epistasia muestran que AdrA actúa en la ruta de síntesis del flagelo por encima de SadB, por lo que podría estar sintetizando el c-di-GMP que une SadB para a su vez activar al factor sigma AlgU, requerido para la transcripción de *amrZ* y por tanto reprimiendo la expresión de *fleQ*. Alternativamente, otra (s) proteínas efectoras de c-di-GMP podrían ser el blanco de AdrA. Estos resultados destacan la importancia en la regulación local del segundo mensajero c-di-GMP involucrada no solo en la regulación de la función flagelar, sino también en la represión de la síntesis del aparato flagelar.

La proteína SadB juega un importante papel en la transducción de señales asociada al movimiento en varias especies del género *Pseudomonas* (Caiazza *et al.*, 2005). Su papel en la represión de la movilidad dependiente de flagelo en *P. fluorescens* F113 está bien caracterizada (Navazo *et al.*, 2009, Martínez-Granero *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconocen las señales que determinan su función. En trabajos realizados en colaboración con el laboratorio de J.G. Malone se ha demostrado que la proteína SadB de *P. fluorescens* F113 es capaz de unir el segundo mensajero c-di-GMP con una afinidad propia de los niveles intracelulares de esta molécula, y que además lo hace formando un dímero (Trampari,

2016). SadB presenta dos dominios con función desconocida, YbaK y HDOD, ambos esenciales para realizar su función (Caiazza & O'Toole, 2004). El dominio HDOD ha sido descrito en diferentes proteínas bacterianas (Hendrixson & DiRita, 2004, Liu *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2016) y su función parece estar relacionada en todas ellas con la movilidad, adherencia y producción de exopolisacáridos, sugiriendo su relación con el segundo mensajero c-di-GMP. En el genoma *P. fluorescens* F113 hemos identificado otras dos proteínas con dominio HDOD, HdmA (PSF113_1408) Y HdmB (PSF113_5572), no reguladas por AmrZ. La interrupción de los genes que codifican estas proteínas genera un fenotipo de movilidad reducida pero no presentan fenotipo de formación de biopelículas. Aunque poseen el mismo dominio HDOD que SadB, estas proteínas parecen actuar de manera inversa a la proteína SadB, activando en vez de reprimiendo, la movilidad en *P. fluorescens* F113. Ambas proteínas están muy conservadas en los genomas de la mayoría de las pseudomonas secuenciadas hasta la fecha, pero es en este trabajo la primera vez que se describe su fenotipo y posible función. Los análisis de expresión han demostrado que HdmA participa directamente en la biosíntesis del aparato flagelar, ya que al interrumpir el gen que la codifica resulta en una gran disminución de la transcripción de la flagelina *fliC*. Además, los análisis de epistasia muestran interacción genética entre HdmA y SadB, así como con el sistema de dos componentes GacA/GacS. Estos resultados demuestran que HdmA forma parte de la ruta de biosíntesis del aparato flagelar en *P. fluorescens* F113, probablemente activando su síntesis. En cambio, el mutante *hdmB* no tiene efecto en la transcripción de *fliC*. Sin embargo, los análisis de epistasia muestran interacción genética entre HdmB con SadB y con el sistema de dos componentes GacA/GacS, por lo que, HdmB también podría participar en la ruta de señalización para la biosíntesis del aparato flagelar de *P. fluorescens* F113.

El descubrimiento de diferentes formas de unión del c-di-GMP, como es el caso de la proteína BldD de *Streptomyces coelicolor* (Tschowri *et al.*, 2014) o las proteínas STING de mamíferos (Shang *et al.*, 2012), sugiere la existencia de receptores de c-di-GMP no descritos hasta la fecha. Su predicción mediante técnicas de bioinformática no es fácil y además requiere aproximaciones experimentales para probarla, como son los análisis de SUPr (*Streptavidin UV Precipitation*) o DraCALA (*Differential Radial Capillary of Ligand Assay*) (Roelofs *et al.*, 2011, Nesper *et al.*, 2012). En este trabajo se han usado estos métodos para identificar si las proteínas HdmA y HdmB unen c-di-GMP, sin embargo, no se han obtenido

resultados concluyentes. En cambio, los resultados obtenidos a través de la técnica SPR (*Surface Plasmon Resonance*) muestran que la constante de afinidad de estas proteínas es similar a la presentada por FleQ (Chou & Galperin, 2016). No obstante, es necesario realizar otros procedimientos más sensibles, como la técnica de calorimetría de valoración isotérmica (ITC) (*Isothermal Titration Calorimetry*), para verificar si unen o no este segundo mensajero (Matsuyama *et al.*, 2017). En el caso de resultar positiva la unión del c-di-GMP a HdmA y HdmB, estas proteínas podrían estar actuando en la regulación de la síntesis del aparato flagelar de *P. fluorescens* F113 compitiendo con SadB y/o FleQ por la unión del c-di-GMP sintetizado por GcbA y Adra, impidiendo así la represión de la síntesis del flagelo. En la siguiente figura se representa el posible modelo de regulación de la síntesis del aparato flagelar teniendo al c-di-GMP como nuevo miembro protagonista.

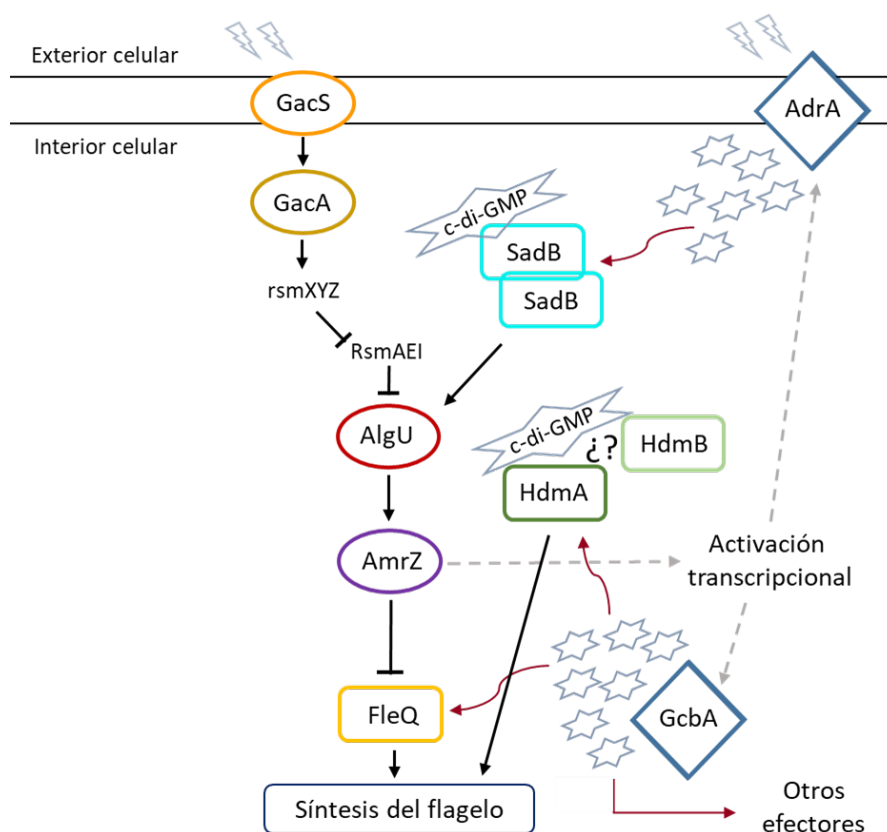


Figura 5.1: Posible modelo de regulación de la síntesis del aparato flagelar con el c-di-GMP como protagonista. El regulador transcripcional AmrZ activa la transcripción de dos DGCs, Adra y GcbA. Estas a su vez sintetizan c-di-GMP que une SadB y posiblemente FleQ, reprimiendo así la síntesis del aparato flagelar. HdmA y HdmB activan la síntesis del flagelo y podrían estar compitiendo con SadB y FleQ por la unión del c-di-GMP sintetizado por ambas DGCs, impidiendo así la represión de la síntesis del aparato flagelar. Las flechas rojas indican posible interacción, no demostrada.

P. fluorescens F113 contiene en su genoma más de 30 genes que codifican proteínas relacionadas con el c-di-GMP. En la siguiente tabla se especifican todos los genes relacionados con este segundo mensajero caracterizados hasta la fecha en esta cepa.

Locus	Nombre de homólogo	Fenotipo		Dominios	Referencia
		Movilidad	Biopelículas		
PSF113_0499	<i>dipA</i> (PA2017)	+	-	GGDEF & EAL	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_0661	<i>gcbA</i> (Pfl01_0623)	+	=	GGDEF	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_0715	<i>YfiN</i> (PA1120)	-	-	GGDEF	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_1090	<i>wspR</i> (PA3702)	+	-	GGDEF	(Navazo <i>et al.</i> , 2009)
PSF113_1323	<i>bifA</i> (PA4367)	-	+	GGDEF & EAL	(Navazo <i>et al.</i> , 2009)
PSF113_1363	-	-	-	GGDEF	
PSF113_1408	-	-	=	HDOD	Este trabajo
PSF113_1559	<i>fleQ</i> (PA1097)	-	-	ATPasa ⁺⁺⁺	(Capdevila <i>et al.</i> , 2004)
PSF113_1982	<i>adrA</i> (PFL_4532)	+	-	GGDEF	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_2333	<i>mucR</i> (PA1727)	-	+	GGDEF	
PSF113_3553	PA4108	-	+	HD-GYP	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_4023	PFL_1902	-	=	GGDEF&EAL	
PSF113_4038	<i>GcbB</i> (Pfl01_1790)	-	=	GGDEF	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_4360	Pfl01_1678	-	=	GGDEF&EAL	
PSF113_4460	<i>flgZ</i>	=	-	PilZ	(Martinez-Granero <i>et al.</i> , 2014a)
PSF113_4657	<i>sadC</i> (PA4332)	+	-	GGDEF	(Navazo <i>et al.</i> , 2009)
PSF113_4681	Pfl01_4551	-	+	GGDEF&EAL	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_4776	<i>GcbC</i> (Pfl01_4666)	-	=	GGDEF	
PSF113_4827	-	-	-	GGDEF	(Muriel <i>et al.</i> , 2018)
PSF113_5064	<i>morA</i> (PA4601)	-	+	GGDEF&EAL	
PSF113_5572	-	-	=	HDOD	Este trabajo
PSF113_5392	PFL_5686	-	-	GGDEF	
PSF113_5782	<i>sadB</i> (PA5346)	+	-	HDOD	(Navazo <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 5.1: Genes relacionados con el c-di-GMP en *P. fluorescens* F113. En la tabla se especifica: el locus; el nombre del gen homólogo en otras cepas de pseudomonas, en las que fue descrito por primera vez; los fenotipos de movilidad tipo *swimming* y de biopelículas presentados por los mutantes, en comparación con la estirpe silvestre; los dominios relacionados con el c-di-GMP; y la referencia de su descripción en F113. De los genes en los que no aparece referencia, han sido estudiados sus fenotipos, pero no publicados hasta el momento.

En el cuarto capítulo de esta memoria, se analizan dos factores implicados en la respuesta ambiental de *P. fluorescens* F113, la capacidad de utilizar óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones alternativos y la movilidad quimiotáctica. A partir de la secuenciación del genoma de *P. fluorescens* F113 se observó que presentaba tres regiones involucradas en el proceso quimiotáctico, así como los genes necesarios para la realización de la desnitrificación (Redondo-Nieto *et al.*, 2013).

La desnitrificación es un proceso microbiano en el cual compuestos oxidados del nitrógeno son usados como aceptores de electrones alternativos para la producción de energía cuando el oxígeno es limitado (Delorme *et al.*, 2003). El genoma de *P. fluorescens* F113 codifica aproximadamente 50 proteínas involucradas en el proceso de desnitrificación, organizadas en cuatro clústeres diferentes y mostrando alta homología con los genes de otras pseudomonas. Además, presenta dos copias de los genes *nor* y *nos*, que podrían estar relacionados con altas tasas de desnitrificación, como ha sido observado en cepas de *Bacillus* (Jones *et al.*, 2011). *P. fluorescens* F113 es capaz de crecer en ausencia de oxígeno utilizando nitrato y nitrito como aceptores de electrones alternativos (Redondo-Nieto *et al.*, 2013). También es capaz de realizar movimiento dependiente de flagelo utilizando el nitrato como aceptor de electrones alternativo, pero no el nitrito, debido seguramente a una falta de energía. Además, se ha observado que la regulación de la movilidad es igual en condiciones de anaerobiosis que la descrita en condiciones aerobias, presentando el mismo fenotipo hipermovil los mutantes en los genes *sadB*, *wspR*, *kinB* y *algU* (Muriel *et al.*, 2015). La desnitrificación biológica juega un importante papel en la colonización de la rizosfera (Jones *et al.*, 2011) y la realizan muchas bacterias, incluyendo a varias especies del género *Pseudomonas* (Rediers *et al.*, 2009, Arat *et al.*, 2015, Garrido-Sanz *et al.*, 2016). La importancia de este proceso en una colonización competente de la rizosfera se debe a que la concentración de oxígeno en este ambiente puede variar desde un 20% hasta menos del 1% (Tiedje *et al.*, 1982). Todos los enzimas que intervienen en el proceso de desnitrificación están activos en presencia de oxígeno, sugiriendo que puede existir un proceso basal de desnitrificación en aerobiosis. Esto podría ayudar a la supervivencia de los microorganismos durante cambios bruscos en la concentración de oxígeno, generándoles un mínimo de energía para sobrevivir. No obstante, el enzima óxido nítrico reductasa (Nos) es bastante sensible al oxígeno (Morley *et al.*, 2008). Estudios realizados por el grupo de Lensi han mostrado que mutantes de *P. fluorescens* en las nitrato o nitrito reductasas son

generalmente deficientes en colonización y competición por nicho en el ambiente rizosférico (Philippot *et al.*, 1995, Ghiglione *et al.*, 2000, Ghiglione *et al.*, 2002). Por tanto, la habilidad de realizar una desnitrificación completa confiere una ventaja selectiva a las pseudomonas fluorescentes en la rizosfera (Delorme *et al.*, 2003). Además, en los últimos años se está analizando la capacidad de varias pseudomonas, como *P. tolaassi* (He *et al.*, 2016) o *P. putida* (Xu *et al.*, 2017) para realizar desnitrificación y poder utilizarlas en descontaminación de aguas residuales.

Por otro lado, la quimiotaxis es un proceso fundamental para entender las interacciones planta-microorganismo, y debido a su gran versatilidad metabólica, en las pseudomonas este proceso ha sido estudiado en profundidad (Sampedro *et al.*, 2015). Los organismos vivos tienen que detectar cambios en las condiciones externas constantemente y ajustar su estado interno para sobrevivir y reproducirse. El sistema de quimiotaxis es un circuito bioquímico que procesa la información química del exterior e interior celular. Análisis genómicos muestran que la mayoría de las bacterias rizosféricas presentan gran número de proteínas quimiorreceptoras (Alexandre *et al.*, 2004), ya que los exudados de las plantas contienen una amplia gama de compuestos orgánicos que funcionan como nutrientes y fuente de carbono para los microorganismos. Además, la relación entre la abundancia de quimiorreceptores y el estilo de vida ha sido clasificada de forma taxonómica, demostrándose que su número no depende del tamaño del genoma, si no del estilo de vida bacteriano (Lacal *et al.*, 2010).

La mayoría de las pseudomonas poseen un único sistema quimiotáctico, como, por ejemplo, *Pseudomonas chlororaphis* (Polonio *et al.*, 2017). Sin embargo, otras, como *P. aeruginosa* (Güvener *et al.*, 2006) y *Pseudomonas syringae* (Clarke *et al.*, 2016) codifican para más de un sistema quimiotáctico. *P. fluorescens* F113 presenta en su genoma tres sistemas quimiotácticos completos, Che1, Che2 y Che3 (Redondo-Nieto *et al.*, 2013) y en este capítulo se demuestra que los tres son funcionales e independientes. Cabe destacar que el sistema Che3 es fundamental para una correcta movilidad quimiotáctica en ambientes carentes de oxígeno. Además, los tres sistemas están implicados en el mantenimiento de una colonización competente de la rizosfera (Muriel *et al.*, 2015).

Análisis genómicos han demostrado más del 30% de los genomas bacterianos presentan más de un gen codificante para las proteínas Che (CheA, B, R, W e Y) (Hamer *et al.*, 2010). Todavía no está claro como estos organismos controlan la regulación de varios sistemas quimiotácticos a la vez, pero sin duda la presencia de más de un sistema quimiotáctico y de gran número de quimiorreceptores hace a algunas bacterias más competitivas y contribuye a la habilidad de sobrevivir y colonizar la rizosfera (Scharf *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que estos sistemas suelen organizarse en operones y en ellos suelen aparecer adyacentes tanto las proteínas CheA y CheW, como CheR y CheB. Esto sugiere una estrecha relación entre estas proteínas, sea por la necesidad de formar un complejo en el caso de las primeras o por estar involucradas en mecanismos de adaptación las segundas (Lovdok *et al.*, 2007). Los sistemas Che2 y Che3 de *P. fluorescens* F113 parecen formar operones, presentando además cada uno de ellos dos genes codificantes para MCP, probablemente implicados en funciones específicas.

Los análisis de los perfiles quimiotácticos, realizados mediante técnica de agar en placa, muestran que prácticamente todos los compuestos típicos de los exudados radiculares son quimioatrayentes para *P. fluorescens* F113, predominando la atracción por los aminoácidos y los ácidos orgánicos que por los azúcares. Dentro de los compuestos aromáticos testados, el que presentó mayor atracción fue el benzoato. En los perfiles quimiotácticos no hubo grandes diferencias entre la estirpe silvestre y los mutantes en la histidin-quinasa de los sistemas Che1 y Che2, a excepción del ácido maleico, donde el mutante *cheA2* responde con menor atracción. Los MCPs propios de este sistema no han sido descritos para este compuesto, no obstante, cabe destacar que los dominios señalizadores de los quimiorreceptores están muy conservados en diferentes especies, siendo a menudo utilizados para la identificación de los mismos en los genomas bacterianos, pero los dominios sensores son muy diversos y varían de unas especies a otras (Krell *et al.*, 2011). Además, al haberse realizado estos ensayos con mutantes en las histidin-quinasas CheA, y no en los MCPs, resulta complicado conocer los perfiles quimiotácticos hacia compuestos concretos, ya que, aunque no se conocen bien los mecanismos moleculares, si se sabe que diferentes sistemas pueden interaccionar entre ellos y que los MCPs pueden señalizar a diferentes proteínas CheA, como ocurre en *Rhodobacter sphaeroides* (Porter *et al.*, 2008). Cabe destacar que el análisis quimiotáctico en placa no es considerado ideal para analizar la movilidad bacteriana hacia o en contra de un compuesto. Es la técnica de

capilares la que muestra más sensibilidad a bajas concentraciones, representando con más certeza lo que ocurre en la naturaleza (Bais *et al.*, 2006).

Para finalizar, cada vez es mayor la especulación sobre la relación entre el segundo mensajero c-di GMP y el sistema quimiotáctico, con en los últimos años varias publicaciones al respecto. Por ejemplo, en uno de estos trabajos se han identificado, en *Azospirillum brasilense*, dominios de unión al c-di-GMP tipo PilZ, en varias proteínas quimiorreceptoras. De esta manera, los niveles de c-di-GMP intracelulares modulan la respuesta quimiotáctica, de manera independiente a las metilaciones, generando una nueva vía de adaptación quimiotáctica (Russell *et al.*, 2013). Un proceso similar ha sido descrito para *P. aeruginosa*, en el que el c-di-GMP regula la movilidad quimiotáctica al unirse al dominio PilZ de la proteína MapZ, alterando de esta forma la actividad de la metiltransferasa CheR. (Orr & Lee, 2016, Xu *et al.*, 2016). Otro trabajo en *P. aeruginosa* describe la relación entre la PDE Pch (DipA en *P. fluorescens* F113) y la proteína CheA en su estado fosforilado. Parece que la maquinaria de quimiotaxis activa a la PDE para generar bajos niveles de c-di-GMP (Kulasekara *et al.*, 2013). Y recientemente, utilizando una aproximación proteómica, han identificado en *Caulobacter crescentus* una nueva familia de proteínas parecidas a CheY, denominadas proteínas Cle (del inglés, *CheY-like c-di-GMP effectors*). Esta familia de proteínas regula la actividad flagelar en respuesta a la unión del segundo mensajero c-di-GMP, de manera similar a como lo hace la proteína CheY fosforilada (Nesper *et al.*, 2017). Sin duda, parece que la regulación básica del c-di-GMP podría haberse expandido rápidamente durante la evolución bacteriana mediante la adquisición de nuevos componentes relacionados con la regulación (Jenal *et al.*, 2017).

Las bacterias poseen numerosos sistemas de transducción de señales que integran las respuestas a los cambios ambientales. Estos sistemas son esenciales para adaptarse a cambios bruscos en el ecosistema que habitan. Este trabajo ha contribuido a ampliar el conocimiento de la movilidad en respuesta al ambiente, integrada por AmrZ en relación con el segundo mensajero c-di-GMP; ha analizado nuevas proteínas relacionadas con el c-di-GMP implicadas en la síntesis del aparato flagelar y ha caracterizado tres sistemas quimiotácticos en *P. fluorescens* F113. Todos estos mecanismos forman parte de una compleja red de señalización que integra la información ambiental para persistir y competir en un nicho ecológico complejo y cambiante como es el rizosférico.

Referencias

- Alexandre G**, Greer-Phillips S & Zhulin IB (2004) Ecological role of energy taxis in microorganisms. *FEMS microbiology reviews* **28**: 113-126.
- Arat S**, Bullerjahn GS & Laubenbacher R (2015) A network biology approach to denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one* **10**: e0118235.
- Arora SK**, Ritchings BW, Almira EC, Lory S & Ramphal R (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *Journal of bacteriology* **179**: 5574-5581.
- Bais HP**, Weir TL, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual review of plant biology* **57**: 233-266.
- Baker AE**, Diepold A, Kuchma SL, Scott JE, Ha DG, Orazi G, Armitage JP & O'Toole GA (2016) PilZ Domain Protein FlgZ Mediates Cyclic Di-GMP-Dependent Swarming Motility Control in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **198**: 1837-1846.
- Barahona E**, Navazo A, Garrido-Sanz D, Muriel C, Martinez-Granero F, Redondo-Nieto M, Martin M & Rivilla R (2016) *Pseudomonas fluorescens* F113 Can Produce a Second Flagellar Apparatus, Which Is Important for Plant Root Colonization. *Frontiers in microbiology* **7**: 1471.
- Baraquet C & Harwood CS** (2013) Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 18478-18483.
- Baynham PJ**, Ramsey DM, Gvozdyev BV, Cordonnier EM & Wozniak DJ (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *Journal of bacteriology* **188**: 132-140.
- Caiazza NC & O'Toole GA** (2004) SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of bacteriology* **186**: 4476-4485.
- Caiazza NC**, Shanks RM & O'Toole GA (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* **187**: 7351-7361.
- Capdevila S**, Martinez-Granero FM, Sanchez-Contreras M, Rivilla R & Martin M (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889-3897.
- Clarke CR**, Hayes BW, Runde BJ, Markel E, Swingle BM & Vinatzer BA (2016) Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato reveals novel chemotaxis pathways associated with motility and plant pathogenicity. *PeerJ* **4**: e2570.
- Chou SH & Galperin MY** (2016) Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *Journal of bacteriology* **198**: 32-46.
- Dahlstrom KM**, Giglio KM, Collins AJ, Sondermann H & O'Toole GA (2015) Contribution of Physical Interactions to Signaling Specificity between a Diguanylate Cyclase and Its Effector. *mBio* **6**: e01978-01915.
- Dahlstrom KM**, Collins AJ, Doing G, Taroni JN, Gauvin TJ, Greene CS, Hogan DA & O'Toole GA (2018) A Multimodal Strategy Used By A Large c-di-GMP Network. *Journal of bacteriology*.
- Dasgupta N**, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S & Ramphal R (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **50**: 809-824.
- de Weert S**, Vermeiren H, Mulders IH, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R & Lugtenberg BJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **15**: 1173-1180.
- Delorme S**, Philippot L, Edel-Hermann V, Deulvot C, Mougél C & Lemanceau P (2003) Comparative genetic diversity of the *narG*, *nosZ*, and *16S rRNA* genes in fluorescent pseudomonads. *Applied and environmental microbiology* **69**: 1004-1012.
- Garrido-Sanz D**, Meier-Kolthoff JP, Goker M, Martin M, Rivilla R & Redondo-Nieto M (2016) Genomic and Genetic Diversity within the *Pseudomonas fluorescens* Complex. *PloS one* **11**: e0150183.
- Ghiglione JF**, Richaume A, Philippot L & Lensi R (2002) Relative involvement of nitrate and nitrite reduction in the competitiveness of *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of maize under non-limiting nitrate conditions. *FEMS microbiology ecology* **39**: 121-127.

- Ghiglione JF**, Gourbiere F, Potier P, Philippot L & Lensi R (2000) Role of respiratory nitrate reductase in ability of *Pseudomonas fluorescens* YT101 to colonize the rhizosphere of maize. *Applied and environmental microbiology* **66**: 4012-4016.
- Güvener ZT**, Tifrea DF & Harwood CS (2006) Two different *Pseudomonas aeruginosa* chemosensory signal transduction complexes localize to cell poles and form and remould in stationary phase. *Molecular microbiology* **61**: 106-118.
- Hamer R**, Chen PY, Armitage JP, Reinert G & Deane CM (2010) Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. *BMC systems biology* **4**: 3.
- He T**, Li Z, Sun Q, Xu Y & Ye Q (2016) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Pseudomonas tolaasii* Y-11 without nitrite accumulation during nitrogen conversion. *Bioresource technology* **200**: 493-499.
- Hendrixson DR & DiRita VJ** (2004) Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular microbiology* **52**: 471-484.
- Jenal U**, Reinders A & Lori C (2017) Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature reviews Microbiology* **15**: 271-284.
- Jones CJ**, Ryder CR, Mann EE & Wozniak DJ (2013) AmrZ modulates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture by directly repressing transcription of the *psl* operon. *Journal of bacteriology* **195**: 1637-1644.
- Jones CJ**, Newsom D, Kelly B, *et al.* (2014) ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens* **10**: e1003984.
- Jones CM**, Welsh A, Throback IN, Dorsch P, Bakken LR & Hallin S (2011) Phenotypic and genotypic heterogeneity among closely related soil-borne N₂⁻ and N₂O-producing *Bacillus* isolates harboring the *nosZ* gene. *FEMS microbiology ecology* **76**: 541-552.
- Krell T**, Lacal J, Munoz-Martinez F, Reyes-Darias JA, Cadirci BH, Garcia-Fontana C & Ramos JL (2011) Diversity at its best: bacterial taxis. *Environmental microbiology* **13**: 1115-1124.
- Kulasekara BR**, Kamischke C, Kulasekara HD, Christen M, Wiggins PA & Miller SI (2013) c-di-GMP heterogeneity is generated by the chemotaxis machinery to regulate flagellar motility. *eLife* **2**: e01402.
- Lacal J**, Alfonso C, Liu X, Parales RE, Morel B, Conejero-Lara F, Rivas G, Duque E, Ramos JL & Krell T (2010) Identification of a chemoreceptor for tricarboxylic acid cycle intermediates: differential chemotactic response towards receptor ligands. *The Journal of biological chemistry* **285**: 23126-23136.
- Lee HM**, Liao CT, Chiang YC, Chang YY, Yeh YT, Du SC & Hsiao YM (2016) Characterization of genes encoding proteins containing HD-related output domain in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Antonie van Leeuwenhoek* **109**: 509-522.
- Liu YF**, Liao CT, Song WL, Hsu PC, Du SC, Lo HH & Hsiao YM (2013) GsmR, a response regulator with an HD-related output domain in *Xanthomonas campestris*, is positively controlled by Clp and is involved in the expression of genes responsible for flagellum synthesis. *The FEBS journal* **280**: 199-213.
- Lovdök L**, Kollmann M & Sourjik V (2007) Co-expression of signaling proteins improves robustness of the bacterial chemotaxis pathway. *Journal of biotechnology* **129**: 173-180.
- Martinez-Granero F**, Rivilla R & Martin M (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Applied and environmental microbiology* **72**: 3429-3434.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2012) The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PloS one* **7**: e31765.
- Martinez-Granero F**, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Gonzalez de Heredia E, Baena I, Martin-Martin I, Rivilla R & Martin M (2014a) Identification of *flgZ* as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PloS one* **9**: e87608.
- Martinez-Granero F**, Redondo-Nieto M, Vesga P, Martin M & Rivilla R (2014b) AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaption in *P. fluorescens* F113. *BMC genomics* **15**: 237.
- Matsuyama BY**, Krasteva PV & Navarro M (2017) Isothermal Titration Calorimetry to Determine Apparent Dissociation Constants (Kd) and Stoichiometry of Interaction (n) of c-di-GMP Binding Proteins. *Methods in molecular biology* **1657**: 403-416.
- Merritt JH**, Brothers KM, Kuchma SL & O'Toole GA (2007) SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of bacteriology* **189**: 8154-8164.

- Molina-Henares MA**, Ramos-Gonzalez MI, Daddaoua A, Fernandez-Escamilla AM & Espinosa-Urgel M (2017) FleQ of *Pseudomonas putida* KT2440 is a multimeric cyclic diguanylate binding protein that differentially regulates expression of biofilm matrix components. *Research in microbiology* **168**: 36-45.
- Morley N**, Baggs EM, Dorsch P & Bakken L (2008) Production of NO, N₂O and N₂ by extracted soil bacteria, regulation by NO₂(-) and O₂ concentrations. *FEMS microbiology ecology* **65**: 102-112.
- Muriel C**, Jalvo B, Redondo-Nieto M, Rivilla R & Martin M (2015) Chemotactic Motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. *PLoS one* **10**: e0132242.
- Muriel C**, Arrebola E, Redondo-Nieto M, *et al.* (2018) AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Scientific reports* **8**: 1979.
- Navazo A**, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martinez-Granero F, Rivilla R & Martin M (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial biotechnology* **2**: 489-498.
- Nesper J**, Reinders A, Glatter T, Schmidt A & Jenal U (2012) A novel capture compound for the identification and analysis of cyclic di-GMP binding proteins. *Journal of proteomics* **75**: 4874-4878.
- Nesper J**, Hug I, Kato S, Hee CS, Habazettl JM, Manfredi P, Grzesiek S, Schirmer T, Emonet T & Jenal U (2017) Cyclic di-GMP differentially tunes a bacterial flagellar motor through a novel class of CheY-like regulators. *eLife* **6**.
- Newell PD**, Monds RD & O'Toole GA (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 3461-3466.
- Orr MW & Lee VT** (2016) A PilZ domain protein for chemotaxis adds another layer to c-di-GMP-mediated regulation of flagellar motility. *Science signaling* **9**: fs16.
- Paulsen IT**, Press CM, Ravel J, *et al.* (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature biotechnology* **23**: 873-878.
- Petrova OE**, Cherny KE & Sauer K (2014) The *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclase GcbA, a homolog of *P. fluorescens* GcbA, promotes initial attachment to surfaces, but not biofilm formation, via regulation of motility. *Journal of bacteriology* **196**: 2827-2841.
- Petrova OE**, Cherny KE & Sauer K (2015) The diguanylate cyclase GcbA facilitates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion by activating BdlA. *Journal of bacteriology* **197**: 174-187.
- Philippot L**, Clays-Josserand A & Lensi R (1995) Use of tn5 mutants to assess the role of the dissimilatory nitrite reductase in the competitive abilities of two pseudomonas strains in soil. *Applied and environmental microbiology* **61**: 1426-1430.
- Polonio A**, Vida C, de Vicente A & Cazorla FM (2017) Impact of motility and chemotaxis features of the rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 on its biocontrol of avocado white root rot. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **20**: 95-104.
- Porter SL**, Wadhams GH & Armitage JP (2008) *Rhodobacter sphaeroides*: complexity in chemotactic signalling. *Trends in microbiology* **16**: 251-260.
- Pryor EE**, Waligora EA, Xu B, Dellos-Nolan S, Wozniak DJ & Hollis T (2012) The transcription factor AmrZ utilizes multiple DNA binding modes to recognize activator and repressor sequences of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *PLoS pathogens* **8**: e1002648.
- Ramsey DM & Wozniak DJ** (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular microbiology* **56**: 309-322.
- Rediers H**, Vanderleyden J & De Mot R (2009) Nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri* A15 and its involvement in rice and wheat root colonization. *Microbiological research* **164**: 461-468.
- Redondo-Nieto M**, Barret M, Morrissey J, *et al.* (2013) Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC genomics* **14**: 54.
- Roelofs KG**, Wang J, Sintim HO & Lee VT (2011) Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein-metabolite interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 15528-15533.
- Roy AB**, Petrova OE & Sauer K (2012) The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. *Journal of bacteriology* **194**: 2904-2915.
- Russell MH**, Bible AN, Fang X, Gooding JR, Campagna SR, Gomelsky M & Alexandre G (2013) Integration of the second messenger c-di-GMP into the chemotactic signaling pathway. *mBio* **4**: e00001-00013.
- Sampedro I**, Parales RE, Krell T & Hill JE (2015) *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS microbiology reviews* **39**: 17-46.

- Sarenko O**, Klauck G, Wilke FM, Pfiffer V, Richter AM, Herbst S, Kaefer V & Hengge R (2017) More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. *mBio* **8**.
- Scharf BE**, Hynes MF & Alexandre GM (2016) Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant-bacteria associations. *Plant molecular biology* **90**: 549-559.
- Schirmer T** (2016) C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. *Journal of molecular biology* **428**: 3683-3701.
- Shang G**, Zhu D, Li N, *et al.* (2012) Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP. *Nature structural & molecular biology* **19**: 725-727.
- Tart AH**, Wolfgang MC & Wozniak DJ (2005) The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ. *Journal of bacteriology* **187**: 7955-7962.
- Tart AH**, Blanks MJ & Wozniak DJ (2006) The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Journal of bacteriology* **188**: 6483-6489.
- Tiedje JM**, Sexstone AJ, Myrold DD & Robinson JA (1982) Denitrification: ecological niches, competition and survival. *Antonie van Leeuwenhoek* **48**: 569-583.
- Trampari E**, Stevenson CE, Little RH, Wilhelm T, Lawson DM & Malone JG (2015) Bacterial rotary export ATPases are allosterically regulated by the nucleotide second messenger cyclic-di-GMP. *The Journal of biological chemistry* **290**: 24470-24483.
- Trampari E** (2016) Allosteric control of type III secretion systems by the second messenger cyclic di-GMP. Departement of Molecular Microbiology, John Innes Center. University of East Anglia. Norwich, UK.
- Tschowri N**, Schumacher MA, Schlimpert S, Chinnam NB, Findlay KC, Brennan RG & Buttner MJ (2014) Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development. *Cell* **158**: 1136-1147.
- Waligora EA**, Ramsey DM, Pryor EE, Jr., Lu H, Hollis T, Sloan GP, Deora R & Wozniak DJ (2010) AmrZ beta-sheet residues are essential for DNA binding and transcriptional control of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Journal of bacteriology* **192**: 5390-5401.
- Wozniak DJ**, Sprinkle AB & Baynham PJ (2003) Control of *Pseudomonas aeruginosa* algZ expression by the alternative sigma factor AlgT. *Journal of bacteriology* **185**: 7297-7300.
- Xiao Y**, Nie H, Liu H, Luo X, Chen W & Huang Q (2016) C-di-GMP regulates the expression of *lapA* and *bcs* operons via FleQ in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology reports*.
- Xu B**, Soukup RJ, Jones CJ, Fishel R & Wozniak DJ (2016) *Pseudomonas aeruginosa* AmrZ Binds to Four Sites in the *algD* Promoter, Inducing DNA-AmrZ Complex Formation and Transcriptional Activation. *Journal of bacteriology* **198**: 2673-2681.
- Xu L**, Xin L, Zeng Y, *et al.* (2016) A cyclic di-GMP-binding adaptor protein interacts with a chemotaxis methyltransferase to control flagellar motor switching. *Science signaling* **9**: ra102.
- Xu Y**, He T, Li Z, Ye Q, Chen Y, Xie E & Zhang X (2017) Nitrogen Removal Characteristics of *Pseudomonas putida* Y-9 Capable of Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification at Low Temperature. *BioMed research international* **2017**: 1429018.
- Yan J**, Deforet M, Boyle KE, Rahman R, Liang R, Okegbe C, Dietrich LEP, Qiu W & Xavier JB (2017) Bow-tie signaling in c-di-GMP: Machine learning in a simple biochemical network. *PLoS computational biology* **13**: e1005677.

Conclusiones

1. En *Pseudomonas fluorescens* F113, AmrZ es un regulador transcripcional global que determina los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP, a través de la regulación de la transcripción de numerosos genes que codifican para diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs), responsables de la síntesis y degradación de este segundo mensajero.
2. Dos DGCs, GcbA y Adra, actúan junto a SadB en la ruta de síntesis del aparato flagelar de *P. fluorescens* F113. Su función podría ser sintetizar c-di-GMP para activar la represión de la síntesis del flagelo en respuesta a señales ambientales desconocidas.
3. Las proteínas HdmA y HdmB están involucradas en la activación de la síntesis del aparato flagelar de *P. fluorescens* F113.
4. *P. fluorescens* F113 es capaz de realizar el proceso de desnitrificación biológica de forma completa. Además, puede realizar movimiento dependiente de flagelo utilizando el nitrato como aceptor de electrones alternativo al oxígeno y la regulación de la movilidad es igual en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis.
5. *P. fluorescens* F113 presenta en su genoma tres sistemas quimiotácticos completos, Che1, Che2 y Che3 y ha sido demostrado que los tres son funcionales e independientes. El sistema Che1 es esencial tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis. El sistema Che2 no es esencial para el movimiento, pero si necesario para que se realice de manera óptima la movilidad quimiotáctica. Por último, el sistema Che3 es esencial para una correcta movilidad quimiotáctica en ambientes carentes de oxígeno. Los tres sistemas están involucrados en una correcta colonización de la rizosfera, siendo el sistema Che1 el que tiene más importancia.

Lista de publicaciones

- Redondo-Nieto M., Barret M., Morrissey J.P., Germaine K., Martínez-Granero F., Barahona E., Navazo A., Sánchez-Contreras M., Moynihan J.A., Giddens S.R., Coppoolse E.R., **Muriel C.**, Stiekema W.J., Rainey P.B., Dowling D., O'Gara F., Martín M. & Rivilla R. **2012**. Genome sequence of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, **194**(5):1273-1274. doi: 10.1128/JB.06601-11.
- Redondo-Nieto M., Barret M., Morrissey J., Germaine K., Martínez-Granero F., Barahona E., Navazo A., Sánchez-Contreras M., Moynihan J.A., **Muriel C.**, Dowling D., O'Gara F., Martín M. & Rivilla R. **2013**. Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. **BMC Genomics**, **14**:54. doi: 10.1186/1471-2164-14-54.
- Muriel C.**, Jalvo B., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Rivilla R. & Martín M. **2015**. Chemotactic Motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under Aerobic and Denitrification Conditions. *PloS One*, **10**(7): e0132242. doi: 10.1371/journal.pone.0132242.
- Barahona E., Navazo A., Garrido-Sanz D., **Muriel C.**, Martínez-Granero F., Redondo-Nieto M., Martín M. & Rivilla R. **2016**. *Pseudomonas fluorescens* F113 can produce a second flagellar apparatus, which is important for plant root colonization. *Frontiers of Microbiology*. 7:1471. doi: 10.3389/fmicb.2016.01471.
- Garrido-Sanz D., Arrebola E., Martínez-Granero F., García-Méndez S., **Muriel C.**, Blanco-Romero E., Martín M., Rivilla R. & Redondo-Nieto M. **2017**. Classification of Isolates from the *Pseudomonas fluorescens* Complex into Phylogenomic Groups Based in Group-Specific Markers. *Frontiers of Microbiology*. **8**:413. doi:10.3389/fmicb.2017.00413.
- Muriel C.**, Arrebola E., Redondo-Nieto M., Martínez-Granero F., Jalvo B., Pfeilmeier S., Blanco-Romero E., Baena I., Malone J.G., Rivilla R. & Martín M. **2018**. AmrZ is a major determinant of c-di-GMP levels in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Scientific Reports* **8**: 1979. doi: 10.1038/s41598-018-20419-9.